



Caractérisation de l'activité fonctionnelle et métabolique des cellules NK en situation de stress nutritionnels : approche expérimentale in vitro et in vivo

Bruno Lamas

► To cite this version:

Bruno Lamas. Caractérisation de l'activité fonctionnelle et métabolique des cellules NK en situation de stress nutritionnels : approche expérimentale in vitro et in vivo. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I, 2012. Français. NNT : 2012CLF1PP02 . tel-01165177

HAL Id: tel-01165177

<https://theses.hal.science/tel-01165177>

Submitted on 18 Jun 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
Année 2012

UNIVERSITE D'Auvergne
N° d'ordre

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
pour l'obtention du grade de Docteur d'Université
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité Biologie-Nutrition

Soutenue le 27 juin 2012

par

LAMAS Bruno

**CARACTERISATION DE L'ACTIVITE FONCTIONNELLE ET METABOLIQUE DES
CELLULES NK EN SITUATION DE STRESS NUTRITIONNELS : APPROCHE
EXPERIMENTALE *IN VITRO* ET *IN VIVO***

Président :

Pr Joëlle GOUDABLE, PU-PH, Santé Publique Nutrition, UMR 1016 INSERM/Université Claude Bernard Lyon 1

Rapporteurs :

Pr Jacques BIENVENU, PU-PH, Immunologie, UMR 851 INSERM/Université Claude Bernard Lyon 1

Dr Yves DUPERTUIS, Directeur de Recherche, Nutrition et Cancer, Hôpitaux Universitaires de Genève

Dr Francis RAUL, Directeur de Recherche, Nutrition et Cancer, IRCAD EA 4438, Université de Strasbourg

Membres :

Pr Marie-Paule VASSON, PU-PH, Biochimie Nutrition, UMR 1019 INRA/Université d'Auvergne, Clermont 1 (Directrice de thèse)

Pr Yves BOIRIE, PU-PH, Nutrition, UMR 1019 INRA/Université d'Auvergne, Clermont 1

Dr Marie-Chantal FARGES, MCU, Biochimie Nutrition, UMR 1019 INRA/Université d'Auvergne, Clermont 1

Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire et Nutrition
UMR 1019 INRA/Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine
Equipe microEnvironnement CellulaiRe, Immunomodulation, Nutrition (ECRIN)
UFR de Pharmacie, Université d'Auvergne, Clermont 1

UNIVERSITE BLAISE PASCAL
Année 2012

UNIVERSITE D'Auvergne
N° d'ordre

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

Thèse

Présentée à l'Université d'Auvergne
pour l'obtention du grade de Docteur d'Université
(Décret du 5 juillet 1984)

Spécialité Biologie-Nutrition

Soutenue le 27 juin 2012

par

LAMAS Bruno

**CARACTERISATION DE L'ACTIVITE FONCTIONNELLE ET METABOLIQUE DES
CELLULES NK EN SITUATION DE STRESS NUTRITIONNELS : APPROCHE
EXPERIMENTALE *IN VITRO* ET *IN VIVO***

Président :

Pr Joëlle GOUDABLE, PU-PH, Santé Publique Nutrition, UMR 1016 INSERM/Université Claude Bernard Lyon 1

Rapporteurs :

Pr Jacques BIENVENU, PU-PH, Immunologie, UMR 851 INSERM/Université Claude Bernard Lyon 1

Dr Yves DUPERTUIS, Directeur de Recherche, Nutrition et Cancer, Hôpitaux Universitaires de Genève

Dr Francis RAUL, Directeur de Recherche, Nutrition et Cancer, IRCAD EA 4438, Université de Strasbourg

Membres :

Pr Marie-Paule VASSON, PU-PH, Biochimie Nutrition, UMR 1019 INRA/Université d'Auvergne, Clermont 1 (Directrice de thèse)

Pr Yves BOIRIE, PU-PH, Nutrition, UMR 1019 INRA/Université d'Auvergne, Clermont 1

Dr Marie-Chantal FARGES, MCU, Biochimie Nutrition, UMR 1019 INRA/Université d'Auvergne, Clermont 1

Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire et Nutrition
UMR 1019 INRA/Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine
Equipe microEnvironnement CellulaiRe, Immunomodulation, Nutrition (ECRIN)
UFR de Pharmacie, Université d'Auvergne, Clermont 1

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Madame le Pr Marie-Paule VASSON, ma directrice de thèse pendant ces trois années. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et permis de travailler dans les meilleures conditions. Je vous remercie également de m'avoir fait bénéficier de votre rigueur scientifique qui m'ont permis de m'améliorer tout au long de ces trois années et de votre acharnement à mener à bien tous les projets, même les plus difficiles.

Je ne peux remercier ma directrice de thèse sans y associer Madame le Dr Marie-Chantal FARGES qui a été également une encadrante précieuse tout au long de ces travaux menés en trio. Merci pour ton incroyable disponibilité et ton efficacité qui sont pour beaucoup dans l'aboutissement de ce travail. Mes plus sincères et chaleureux remerciements pour tes conseils, tes connaissances, ta gentillesse et ton hospitalité. Tu auras été un peu ma deuxième maman durant ces trois années.

Je souhaite particulièrement remercier les membres du jury.

Madame le Pr Joëlle GOUDABLE pour avoir accepté d'examiner ce travail et de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse.

Monsieur le Pr Jacques BIENVENU, Monsieur le Dr Yves DUPERTUIS et Monsieur le Dr Francis RAUL d'avoir aimablement accepté d'être rapporteurs de cette thèse, malgré leurs nombreuses charges professionnelles.

Monsieur le Pr Yves BOIRIE pour avoir accepté de juger ce travail finalisé après avoir activement participé au Comité de thèse. Vos questions pertinentes et vos conseils sont précieux.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur le Pr Pierre VERRELLE pour ses conseils avisés et le temps qu'il a consacré à évaluer ce travail dans le cadre du Comité de thèse.

Je souhaite aussi remercier Madame Florence MISHELLANY pour son aide précieuse dans les analyses histologiques et pour sa gentillesse.

Merci à Madame le Pr Emmanuelle CHARAFE-JAUFFRET pour m'avoir accueilli dans son laboratoire au cours d'une semaine de mobilité à Marseille et d'avoir pris le temps de me former à la technique expérimentale d'injection orthotopique au niveau des glandes mammaires de souris.

Je voudrais exprimer mes plus sincères remerciements à tous les membres du Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire et Nutrition.

Un grand merci à Juliette pour m'avoir encadré durant mon stage de M2 et m'avoir transmis ton savoir-faire en culture cellulaire. Je te remercie également pour tes conseils, ta gentillesse et ta disponibilité.

Un grand merci à Rachida pour m'avoir transmis tes compétences en immunohistologie. Je pense que sans toi je n'aurais pas pu faire tous ces marquages. Mes plus sincères et chaleureux remerciements pour tes conseils, ta disponibilité et pour m'avoir permis de m'évader de ma rédaction de thèse pendant quelques instants lors de mes pauses quotidiennes.

Stéphanie, je tiens à te remercier pour ton aide lors des expérimentations mais, surtout pour ta bonne humeur et l'ambiance que tu amènes au laboratoire. Tu laisses un vide le mercredi quand tu n'es pas là. Merci aussi à Nicolas, Adrien, Jérémy et Ghislain pour tous vos conseils scientifiques et méthodologiques pertinents et tous les bons moments de travail et d'amitié partagés. Je voudrais remercier Kristell pour sa bonne humeur et pour avoir instauré la pause « mots croisés » le midi. Je n'oublie pas non plus de remercier Sandrine pour la joie de vivre qu'elle apporte trois fois par semaine au laboratoire.

Je remercie aussi les autres étudiants thésards avec qui on partage toutes les galères de la thèse mais, aussi et surtout les bons moments à la paillasse ou ailleurs. Je pense à Carla et Sinda, bon courage pour votre thèse et encore merci pour tous les bons gâteaux. Loic et Nina, votre bonne humeur et vos bons petits plats me manquent (Pillule un peu moins par contre).

Un merci tout particulier à Emilie et Benoit, Elodie et Eric ainsi que Tatiana et Jérémie pour tous les bons moments passés en votre compagnie depuis de nombreuses années. Même si on prend tous des chemins différents, j'espère que notre amitié perdurera.

Je profite aussi de ces quelques lignes pour adresser mes sincères remerciements à mes amis de Figeac qui sont toujours partants pour faire la fête et qui m'accueillent les bras ouverts à chaque retour. Merci à Virginie, Laurie, Camille, Jessy, Olivier, Didier, Germain, Benjamin et mon Gros (Cyril) pour m'avoir permis de décompresser le week-end, pour votre bonne humeur, pour vos excellentes soirées déguisées et surtout pour votre soutien sans faille (Bostella forever !!!).

Ensuite mes remerciements vont à ma famille. Merci maman et papa de m'avoir soutenu au cours de mes longues études et merci pour vos sacrifices qui m'ont permis d'arriver jusque là. Vous avez toujours su me montrer le côté positif des choses pour avancer, même quand c'était difficile. Merci de m'avoir inculqué vos notions de sacrifice et de courage. Je remercie aussi mon frère d'être ce qu'il est. Merci de ton soutien, ta joie de vivre et pour tous les bons moments passés ensemble depuis bientôt 25 ans. Je voudrais également dire un grand merci à tous mes oncles, tantes et cousins qui sont éparpillés dans le monde entier pour leur soutien et leur amour. Un merci tout particulier à mes grand-parents qui, je pense, sont ou auraient été fiers de moi.

Pour finir, je voudrais te dédier cette thèse, Priscilla, pour m'avoir supporté avant et durant la rédaction de la thèse (et ce n'est pas facile), pour l'amour que tu me témoignes au quotidien et pour l'avenir que je souhaite profondément construire avec toi, peu importe l'endroit.

Sommaire

Résumé	i
Abstract	ii
Liste des abréviations	iii
Liste des tableaux	v
Liste des figures	vi
Introduction	1
Partie I Contexte scientifique et problématique	4
I) La réponse immune anti-tumorale	5
I-1 La réponse immune adaptative anti-tumorale	5
I-1-1 L'activation de la réponse immune adaptative	5
I-1-1-a La signalisation par le TCR	6
I-1-1-b Le signal de co-stimulation	6
I-1-1-c La synapse immunologique	8
I-1-2 Acquisitions des fonctions effectrices des LT et rôles dans la réponse immune anti-tumorale	9
I-1-2-a Les LT CD8 cytotoxiques	9
I-1-2-b Les LT CD4 auxiliaires	10
I-1-3 La mémoire immunitaire associée aux LT	11
I-1-4 Les lymphocytes B	11
I-2 La réponse immune innée anti-tumorale	12
I-2-1 Les lymphocytes NKT	12
I-2-2 Les lymphocytes T gamma-delta	13
I-2-3 Les cellules dendritiques	14
I-2-4 Les cellules NK	14
I-2-4-a Le développement des cellules NK	15
I-2-4-b Les récepteurs des cellules NK	19
I-2-4-c Education des cellules NK : activation et tolérance du Soi (self tolérance)	38
I-2-4-d Fonctions effectrices des cellules NK	41
II) Les mécanismes d'échappement des tumeurs à l'immunosurveillance	55
II-1 Mécanismes d'échappement tumoral liés à des modifications membranaires des cellules tumorales ..	55
II-1-1 Perte ou diminution de l'expression des molécules du CMH de classe I	55
II-1-2 Expression tumorale de protéines de la famille du TNF	56
II-1-3 Expression des molécules HLA-G et HLA-E	56
II-1-4 Réduction ou surexpression des ligands de NKG2D	57
II-2 L'échappement tumoral lié aux effecteurs immuns	58
II-2-1 Lymphocytes Treg	58
II-2-2 Macrophages associés aux tumeurs	58
II-2-3 Les cellules dendritiques	60
II-2-4 Les cellules suppressors dérivées des myéloïdes	61
II-3 Les mécanismes d'échappement tumoral modulés par des facteurs micro-environnementaux	62
II-3-1 L'indoléamine 2,3-dioxygénase	62
II-3-2 Le TGF- β	64
II-3-3 Le VEGF	65
II-3-4 L'IL-10	66
II-3-5 La cyclo-oxygénase 2	67
II-3-6 Les oxydes nitriques synthases et les arginases	68
II-3-6-a Le métabolisme de l'arginine	68
II-3-6-b Les NOS dans la réponse anti-tumorale	69
II-3-6-c Les NOS dans l'échappement tumoral	71
II-3-6-d Les arginases dans l'échappement tumoral	72
II-3-6-e Coopération des NOS et des arginases dans l'immunosuppression	75
II-3-7 La leptine	76
II-3-7-a Les récepteurs de la leptine	77

II-3-7-b La leptine et les cellules cancéreuses mammaires.....	78
II-3-7-c La leptine et les cellules immunitaires	80
III) Impact du stress métabolique dans la cancérogenèse et la vigilance anti-tumorale.....	83
III-1 Les acides gras	84
III-1-1 Les acides gras et la cancérogenèse.....	84
III-1-2 Les acides gras et la réponse immune.....	87
III-2 L'insuline like growth factor-1	91
III-2-1 L'insuline like growth factor-1 et le cancer	91
III-2-2 L'IGF-1 dans l'immunosurveillance	92
III-3 Les œstrogènes.....	93
III-3-1 Les œstrogènes dans la cancérogenèse	93
III-3-2 Les œstrogènes et la vigilance anti-tumorale.....	95
Objectifs du travail de thèse	98
Partie II Travaux de recherche.....	100
Etude n°1.....	100
Impact <i>in vivo</i> d'un régime hypercalorique sur le développement tumoral mammaire et la réponse anti-tumorale des cellules NK	100
Présentation de l'étude n°1	101
Publication n°1	103
Dietary fat without body weight gain increases in vivo MCF-7 human breast cancer cells growth and decreases Natural Killer cytotoxicity.....	103
Etude n°2.....	134
Effets <i>in vitro</i> de concentrations élevées de leptine sur les capacités prolifératives, métaboliques et fonctionnelles des cellules NK-92.....	134
Présentation de l'étude n°2	135
Publication n°2	137
Leptin modulates dose-dependently the metabolic and cytolytic activities of NK-92 cells	137
Etude n°3.....	159
Impact <i>in vitro</i> d'une déplétion en arginine sur la fonctionnalité des cellules NK	159
Présentation de l'étude n°3	160
Publication n°3	162
Altered functions of Natural Killer cells in response to L-arginine availability.....	162
Partie III Discussion.....	185
Partie IV Conclusion et perspectives	196
Partie V Références bibliographiques	198
Partie VI Production scientifique.....	249

Résumé

Les cellules Natural Killer (NK), actrices majeures de la vigilance anti-tumorale, sont modulées par des facteurs nutritionnels et métaboliques. L'inhibition de leur activité favorise le développement tumoral. Un régime alimentaire hypercalorique induisant l'obésité est un facteur de risque de développer un cancer du sein. Au niveau du micro-environnement tumoral mammaire, la biodisponibilité en certaines molécules contrôle non seulement les cellules néoplasiques mais, également les cellules immunes infiltrées. Ainsi, la leptine, sécrétée à forte concentration par les adipocytes mammaires, pourrait favoriser la croissance tumorale et altérer les cellules NK. L'arginine fortement consommée par les cellules tumorales et les cellules suppressors dérivées des myéloïdes pourrait faire défaut aux cellules NK.

L'objectif de cette thèse est de caractériser les activités fonctionnelles et métaboliques des cellules NK en situation de stress nutritionnel. Dans un premier temps, nous avons exploré, *in vivo*, l'impact d'un régime hypercalorique sur l'activité des cellules NK et sur le développement tumoral mammaire. Ensuite, nous avons cherché à identifier les potentielles altérations fonctionnelles des cellules NK en mimant, *in vitro*, les conditions retrouvées au niveau du micro-environnement tumoral telles que la présence de concentration élevée en leptine et la déplétion en arginine.

Des souris Balb-c « nude » femelles ont été soumises à un régime hypercalorique (HC) *versus* une diète normo-calorique (NC) pendant 6 mois. Au bout de 5 mois, des cellules tumorales mammaires (MCF-7 ; groupes NCT et HCT) ou le véhicule (groupes NC et HC) ont été implantés au niveau de la quatrième paire de glandes mammaires. Sous régime HC, le développement tumoral s'accompagne d'une perte de masse grasse, de masse maigre et de poids corporel avec un volume et un poids de tumeur augmentés. Cette diète induit au niveau tumoral une sur-expression des ARNm d'enzymes impliquées dans la glycolyse et une sous-expression des acteurs du cycle de Krebs. Sous régime HC, l'expression de la caspase 3 clivée et des récepteurs des œstrogènes β et de la progestérone est réduite alors que celle du Ki67 est accrue. Les cellules NK des souris HC ont une cytotoxicité diminuée. Bien que la présence de tumeur stimule l'activité lytique des cellules NK, la cytotoxicité de ces cellules reste inférieure dans le groupe HCT comparativement à celle du groupe NCT.

La leptine stimule, *in vitro*, de façon dose-dépendante l'activité métabolique des cellules NK. A fortes concentrations, elle active leur cytotoxicité vis-à-vis des cellules cibles MDA-MB-231. Cet effet passe par une stimulation de l'expression de TRAIL et de l'IFN- γ par les cellules NK. En revanche, vis-à-vis des cellules cibles MCF7, les cellules NK présentent une activité lytique réduite en présence de fortes concentrations de leptine, probablement en lien avec une réduction de l'expression de la perforine.

En réponse à une déplétion en arginine dans le milieu de culture, la prolifération et la cytotoxicité des cellules NK sont abaissées. L'altération de la reconnaissance des cellules cibles par les récepteurs NKp46 et NKp30, la moindre transmission du signal activateur par la chaîne ζ et la faible production d'IFN- γ peuvent expliquer l'inhibition de la cytotoxicité des cellules NK.

Ainsi, un apport énergétique élevé favorise le développement tumoral mammaire notamment en inhibant la cytotoxicité des cellules NK. De plus, la leptine à fortes concentrations stimule ou réduit, *in vitro*, la cytotoxicité des cellules NK selon la nature des cellules cancéreuses mammaires cibles. Une déplétion en arginine, *in vitro*, quant à elle, inhibe la prolifération et la cytotoxicité des cellules NK. Ces travaux contribuent à mieux comprendre l'impact du micro-environnement sur la réponse anti-tumorale des cellules NK.

Mots clés : cellules natural killer, modulation nutritionnelle, leptine, arginine, tumeurs mammaires humaines, xénogreffe, souris « nude ».

Abstract

Natural killer (NK) cells are critical mediators of anti-tumor immunity. A high-calorie diet inducing obesity is associated with breast cancer development. NK cells are modulated by dietary and metabolic factors and a decrease in their lytic activity promotes mammary tumor development. In the breast microenvironment, high concentration of leptin can be secreted by mammary adipocytes and thereby could stimulate tumor growth and control immune cells. Arginine, strongly consumed by tumor and myeloid-derived suppressor cells, could be lacking to NK cells.

The aim of this work is to characterize the functional and metabolic activities of NK cells in response to nutritional stress. Initially, we explored *in vivo* the impact of a high-calorie diet on NK cells activity and mammary tumor development. Then, we identified potential functional alterations in NK cells by mimicking the conditions found in the tumor microenvironment such as the presence of high leptin concentration and arginine depletion.

Female Balb-c nude mice were fed a high-caloric diet (HC) *versus* a standard caloric diet (SC) for 6 months. After five months, mammary tumor cells (MCF-7, SCT, HCT) or MatrigelTM (SC, HC) were implanted into the fourth mammary fat pads. The tumor development in HC diet-fed mice was associated with a decrease in body weight, body fat and lean mass and an increase in volume and weight of tumors. This diet induced tumor over-expression, at the transcriptional level, of enzymes involved in glycolysis and a down-expression of citrate cycle actors. Protein tumor levels of cleaved caspase 3, estrogen β and progesterone receptors were reduced while Ki67 was increased in the HC diet-fed mice. NK cell cytotoxicity of HC diet-fed mice was reduced. Although the presence of tumor stimulated NK cell lytic activity, this later was lower in the HCT group compared to the one of SCT mice.

In vitro, leptin stimulated, in dose-dependent manner, the metabolic activity of NK cells. High leptin concentrations enhanced NK cell cytotoxicity against the MDA-MB-231 target cells. This phenomenon involved the increase of expression of TRAIL and IFN- γ in NK cells. However, against the MCF-7 target cells, NK cell lytic activity was reduced in the presence of high concentrations of leptin, probably in link to the decreased perforin expression.

NK cell proliferation and cytotoxicity were impaired in response to arginine depletion. This inhibition of NK cell cytotoxicity could be linked to a low target cells recognition by NKp46 and NKp30, a reduced activating signal transmission by ζ chain and a low production of IFN- γ .

Thus, high energy intake promotes mammary tumor development in particular by inhibiting NK cell cytotoxicity. *In vitro*, high leptin concentrations stimulate or reduce NK cell cytotoxicity according to the breast cancer cell targets. Furthermore, arginine depletion inhibits NK cell proliferation and cytotoxicity *in vitro*. These findings provide insight into the microenvironment impacts on NK cell antitumor response in tumor development.

Keywords: Natural killer cells, nutritional modulation, leptin, arginine, human mammary tumor, xenograft, nude mice.

Liste des abréviations

AARE : Eléments de réponse aux acides aminés	IGFBP : IGF-binding protéine
ADCC : Antibody-dependent cellular cytotoxicity	IL : Interleukine
AP-1 : Activator protein-1	IL-1R^{hi} iNK : Cellule NK exprimant fortement le récepteur de l'IL-1
Ape1 : Endonucléase apurinic 1	ILT : Immunoglobulin like transcripts
Arg : Arginine	IMC : Indice de masse corporelle
BAT3 : HLA-B-associated transcript 3	IRAK : IL-1R-associated kinase
CD122 : Sous-unité β du récepteur de l'IL-2 et l'IL-15	ITAM : Immunoreceptor tyrosine-based activating motif
CD132 : Sous-unité γ du récepteur de l'IL-2 et l'IL-15	ITIM : Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
CD25 : Sous-unité α du récepteur de l'IL-2	J : Joining
cdk : Cyclin-dependent kinase	JAK : Janus tyrosine kinase protein
CMH I : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe I	JNK : JUN N-terminal kinase
CMH II : Complexe majeur d'histocompatibilité de classe II	KARAP : Killer cell-activating receptor-associated polypeptide
COX2 : Cyclooxygénase 2	KIR : Killer immunoglobulin-like receptor
CPA : Cellule présentatrice d'antigène	KLRK1 : Killer cell lectin-like receptor subfamily k, membre 1
CSF-1 : Colony-stimulating factor 1	LAT : Linker of activated T cell
CTLA-4 : Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4	LB : Lymphocyte B
D : Diversity	LCR : Leukocyte receptor cluster
DAP12 : DNAX-activated polypeptide of 12 kDa	LFA-1 : Lymphocyte function associated antigen-1
DBL : Duffy-binding-like	LIR : Leucocyte Ig like receptors
DC : Cellule dendritique	L-NMA : N-monomethyl-L-arginine
DISC : Death-inducing signaling complex	LT CM : Lymphocyte T de la mémoire centrale
DNAM-1 : DNAX accessory molecule-1	LT EM : Lymphocyte T de la mémoire effectrice
EMR : Ezrin, moesin et radixin	LT : Lymphocyte T
ERE : Eléments de réponse aux œstrogènes	LTCd4 : Lymphocyte T CD4 ⁺
ERK : Extracellular signal regulated kinase	LTCd8 : Lymphocyte T CD8 ⁺
FADD : Fas-associated death domain protein	MAC-1 : Macrophage receptor-1
Fas-L : Fas-ligand	MAPK : Mitogen-associated protein kinase
GCN2 : General control nonderepressible 2	mDC : Cellule dendritique myéloïde
GITR : Glucocorticoid induced TNFR family related	MEK : Mitogenic-extracellular signal regulated kinase
GM-CSF : Granulocyte macrophage colony stimulating factor	MFI : Intensité moyenne de fluorescence
Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2	MIC A et MIC B : CMH I chain-related protein A et B
H60 : Histocompatibility antigen 60	MMP-9 : Matrix métalloprotéinase 9
HIF : Hypoxia-inducible factor	MSDC : Myeloid-derived suppressor cells
HMG-2 : High motility group 2 protein	MTOC : Microtubule organizing centre
Hsp : Heat shock protein	mTOR : Mammalian target of rapamycin
HVEM : Herpes virus entry mediator	MULT1 : Murine UL-16-binding protein like transcript-1
ICAM-1 : Intercellular adhesion molecule-1	MyD88 : Myeloid differentiation factor 88
iDC : Cellule dendritique immature	N-CAM : Neuronal cell adhesion molecule
IDO : Indoleamine 2,3-dioxygenase	NCR : Natural cytotoxicity receptors
IFN-γ : Interféron- γ	
IGF-1 : Insulin growth factor-1	

NF- κ B : Nuclear factor κ B
NK : Natural Killer
NKC : NK complex
NKT : Natural Killer T
NM23-H1 : Nonmetastatic protein 23 homologue 1 (NM23-H1)
NOHA : N-Hydroxy-L-Arg
Nor-NOHA : N-Hydroxy-nor-L-Arg
pDC : cellule dendritique plasmacytoïdes
PfEMP-1 : *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein -1
PGE2 : Prostaglandine E2
PI3K : Phosphatidylinositol 3 kinase
PKC : Protéine kinase C
PMA : Phorbol myristate acetate
pp32 : Phosphoprotéine 32
PPAR : Peroxisomal proliferated-activated receptor
Pré-NK : Précurseur des cellules NK
Pro-NK : Progéniteur des cellules NK
PYK 2 : Proline rich tyrosine kinase 2
RAE : Retinoic acide early inducible
RAET : Retinoic acid early transcript
RAG : Recombination activating gene
RE : Récepteur des œstrogènes
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
RSS : Séquences signal de recombinaison
SHBG : Sex-hormone binding globulin
SNAP : S-nitroso-N-acetylpenicillamine
SNARE : Soluble NSF attachment protein receptors

STAT : Signal transducer and activator of transcription protein
Syk : Spleen tyrosine kinase
TAM : Tumor associated macrophage
TCR : Récepteur pour l'antigène des lymphocytes T
TiDC : Cellule dendritique immature infiltrant la tumeur
TLR : Toll-like receptors
TNF : Tumor necrosis factor
TNFR : Tumor necrosis factor receptor
TRAF : TNFR associated factor
TRAIL : Tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand
t-SNARE : target-SNARE
TYK2 : Tyrosine kinase 2
ULBP : UL16 binding protein
V : variable
VAMP 7 : Vesicle associated membrane 7
VEGF : Vascular endothelial growth factor
v-SNARE : Vesicular-SNARE
WASP : Wiskott-Aldrich syndrome protein
ZAP-70 : ζ -associated protein kinase of 70 kDa
 α -Galcer : α -galactosylcéramide
 ζ : Chaîne zéta

Liste des tableaux

Tableau 1	Susceptibilité des souris immunodéficientes aux carcinogènes	p5
Tableau 2	Liste non exhaustive des clusters de différenciation	p16
Tableau 3	Haplotypes des récepteurs KIR les plus représentés dans la population humaine	p22
Tableau 4	Pathologies associées à l'expression des récepteurs KIR	p24
Tableau 5	Régulation fonctionnelle des cellules NK par les cytokines	p30
Tableau 6	Impact de l'obésité sur la fonctionnalité des cellules immunes	p83

Liste des figures

Figure 1	Structure du TCR des lymphocytes T	p6
Figure 2	Réarrangement du TCR des lymphocytes T	p6
Figure 3	Transduction du signal du TCR des lymphocytes T	p6
Figure 4	Activation des LT naifs et inhibition des LT activés <i>via</i> les molécules B7	p7
Figure 5	Les différentes liaisons TNF/TNFR	p7
Figure 6	Expression des différents TNFR après stimulation en fonction du temps	p7
Figure 7	Transduction du signal TNF/TNFR	p8
Figure 8	Organisation schématique des protéines du TCR avant et après son engagement	p8
Figure 9	Représentation schématique de la formation d'une synapse immunologique entre un lymphocyte T (LT) et une cellule présentatrice d'antigène (CPA)	p9
Figure 10	Développement et activité sécrétoire des sous-populations lymphocytaires T	p10
Figure 11	Rôles des LT CD4 dans le micro-environnement tumoral	p10
Figure 12	Différenciation des LT mémoires	p11
Figure 13	Actions stimulatrice et inhibitrice des NKT sur la réponse immune anti-tumorale	p13
Figure 14	Développement et migration des cellules NK	p15
Figure 15	Modèle de différenciation des cellules NK humaines <i>in vivo</i>	p15
Figure 16	Structure des KIR inhibiteurs et activateurs	p19
Figure 17	Voie de signalisation des KIR inhibiteurs	p19
Figure 18	Voie de signalisation des KIR activateurs	p20
Figure 19	Structure des récepteurs KIR2DL4	p21
Figure 20	Diversité des KIR à la surface des cellules NK selon les individus	p22
Figure 21	Impact des polymorphismes alléliques sur le répertoire des KIR à la surface des cellules NK et sur la réponse de ces cellules	p23
Figure 22	Localisation chromosomique des gènes codant pour les récepteurs KIR et les HLA	p23
Figure 23	Structure des récepteurs de la famille ILT/LIR	p24
Figure 24	Organisation du complexe NK (NKC) dans le chromosome 12	p25
Figure 25	Structure des récepteurs CD94/NKG2	p25
Figure 26	Structure des récepteurs NKG2D	p26
Figure 27	Potentialisation du signal de NKG2D par l'IL-15	p27
Figure 28	Illustration schématique des ligands de NKG2D humain et murin	p27
Figure 29	Réponse anti-tumorale des cellules immunes <i>via</i> le récepteur NKG2D	p28
Figure 30	Structure du récepteur NKp46	p28
Figure 31	Structure du récepteur NKp44	p29
Figure 32	Structure du récepteur NKp30	p30
Figure 33	Structure du récepteur de l'IL-2 et de l'IL-15	p31
Figure 34	Voies de signalisation des récepteurs de l'IL-2 ou de l'IL-15	p31
Figure 35	Structure du récepteur de l'IL-21	p32
Figure 36	Structure du récepteur de l'IL-12 et transduction du signal	p33
Figure 37	Structure du récepteur de l'IL-18 et transduction du signal	p34
Figure 38	Représentation schématique des 4 familles de chimiokines	p36
Figure 39	Structure des récepteurs de chimiokines et transduction du signal	p36
Figure 40	Expression des récepteurs de chimiokines par les cellules NK humaines et murines	p37
Figure 41	Régulation de la cytotoxicité des cellules NK	p38
Figure 42	Education des cellules NK : hypothèse « arming »	p39
Figure 43	Education des cellules NK : hypothèse « disarming »	p40
Figure 44	Education des cellules NK : hypothèse rhéostat	p41
Figure 45	Etape d'initiation d'une synapse immunologique entre une cellule NK et une cellule cible	p42
Figure 46	Etape effectrice d'une synapse immunologique entre une cellule NK et une cellule cible	p42
Figure 47	Etape de résiliation d'une synapse immunologique entre une cellule NK et une cellule cible	p43

Figure 48	Cytotoxicité des cellules NK par la voie dépendante de l'exocytose des granules lytiques	p44
Figure 49	Induction de la mort cellulaire par le granzyme A des cellules NK	p45
Figure 50	Induction de la mort cellulaire par le granzyme B des cellules NK	p46
Figure 51	Voies de signalisation impliquées dans l'apoptose induite par le récepteur de mort Fas	p47
Figure 52	Voies de signalisation impliquées dans l'apoptose induite par le récepteur de mort TRAIL-R	p48
Figure 53	Modulation de la réponse immune innée par les sécrétions cytokiniques des cellules NK	p50
Figure 54	Différenciation et régulation des iDC par les cellules NK	p51
Figure 55	Activation des lymphocytes T après contact direct avec les cellules NK	p53
Figure 56	Représentation schématique du concept « d'immunoediting » tumoral	p55
Figure 57	Mécanismes tumoraux d'échappement à la réponse immune	p55
Figure 58	Environnement cytokinique induisant la différenciation des macrophages en TAM	p59
Figure 59	Différenciation et migration des MSDC	p61
Figure 60	Catabolisme du tryptophane dépendant de l'IDO	p62
Figure 61	Régulation des cellules immunes par le TGF- β du micro-environnement tumoral	p65
Figure 62	Synthèse de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique <i>via</i> les cyclo-oxygénases	p67
Figure 63	Métabolisme cellulaire de l'arginine	p69
Figure 64	Action du NO $^{\circ}$ endogène dans les cellules NK	p70
Figure 65	Inhibition par le NO $^{\circ}$ de l'activation des LT <i>via</i> la modulation des voies de signalisation de l'IL-2	p72
Figure 66	Evaluation de l'argininémie chez des patients cancéreux	p73
Figure 67	Argininémie des patients atteints de carcinome rénal	p73
Figure 68	Dysfonctionnement des lymphocytes T induit par l'arginase I des cellules suppresseurs dérivées des myéloïdes (MSDC)	p74
Figure 69	Contrôle de la traduction par eIF2 α	p74
Figure 70	Inhibition par la déplétion en arginine de l'activation des LT <i>via</i> la régulation de la traduction	p75
Figure 71	Inhibition de la réponse des LT par les espèces réactives de l'oxygène	p75
Figure 72	Evolution de la leptinémie selon l'indice de masse corporelle	p77
Figure 73	Structure des isoformes du récepteur de la leptine	p77
Figure 74	Induction de la voie MAPK par la leptine	p79
Figure 75	Induction de la voie JAK/STAT par la leptine	p79
Figure 76	Induction de la voie PI3K par la leptine	p79
Figure 77	Effet de la leptine sur la réponse immune innée et adaptative	p82
Figure 78	Mécanismes d'action des acides gras alimentaires sur la réponse immune	p88
Figure 79	Rôles des principaux eicosanoïdes dans la régulation de l'inflammation et de l'immunité	p91
Figure 80	Effet de l'obésité sur la production d'IGF-1	p91
Figure 81	Voies de signalisation de l'IGF-1R	p92
Figure 82	Effet de l'obésité sur la production de certaines hormones	p93
Figure 83	Voies de signalisation des récepteurs des œstrogènes	p94

Introduction

Introduction

Les cellules Natural Killer (NK) font partie de l'immunité innée et représentent 10 à 15% des lymphocytes circulants (Trinchieri, G. 1989). Chez l'adulte, elles se développent principalement dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques (Freud, A.G. and Caligiuri, M.A. 2006) et acquièrent un répertoire complexe de récepteurs activateurs et inhibiteurs, ainsi que des récepteurs de cytokines et de chimiokines au cours de leur maturation (Freud, A.G. and Caligiuri, M.A. 2006). Durant cette phase, elles deviennent tolérantes vis-à-vis du Soi (Jonsson, A.H. and Yokoyama, W.M. 2009). Sur le plan fonctionnel, les cellules NK ont un rôle essentiel dans les mécanismes de défenses anti-infectieuse et anti-tumorale d'une part, par la capacité à lyser les cellules infectées ou tumorales et d'autre part, par la production de cytokines (Zompi, S. and Colucci, F. 2005). Parmi ces dernières, certaines comme l'IFN- γ ont un rôle déterminant dans l'orientation de la réponse immunitaire adaptative (Cooper, M.A. et al. 2001a).

De nombreux mécanismes moléculaires permettent à la tumeur d'échapper ou d'interférer avec la réponse immune anti-tumorale. Ils peuvent être classés en différentes catégories selon qu'ils sont inhérents aux cellules néoplasiques, au micro-environnement tumoral ou aux effecteurs du système immunitaire. Le cancer du sein, le plus fréquent chez la femme, représente le quart de l'ensemble des pathologies cancéreuses avec 1,4 millions de nouveaux cas diagnostiqués dans le monde en 2008 (Ferlay, J. et al. 2010). Malgré la diminution du taux de mortalité par cancer du sein en Europe et aux Etats-Unis (Kohler, B.A. et al. 2011; Bosetti, C. et al. 2012), ce cancer demeure la seconde cause de décès chez la femme toutes pathologies confondues (Jemal, A. et al. 2010). Parmi les facteurs environnementaux susceptibles de contribuer à cette incidence élevée, l'alimentation hypercalorique favorisant la prise de poids et l'obésité est positivement corrélée au risque de développer un cancer du sein (Hursting, S.D. and Berger, N.A. 2010; Roberts, D.L. et al. 2010). La personne obèse présente fréquemment une immunodéficience se traduisant notamment par une diminution du nombre et de la cytotoxicité des cellules NK (Scanga, C.B. et al. 1998; Lynch, L.A. et al. 2009; O'Shea, D. et al. 2010). De plus, l'activité des cellules NK peut être modulée par différents facteurs nutritionnels et métaboliques (Lynch, L.A. et al. 2009; Oberlies, J. et al. 2009; Wrann, C.D. et al. 2012) et une réduction de leur activité favorise le développement tumoral mammaire (Dewan, M.Z. et al. 2007). Des cytokines et des chimiokines sécrétées par le tissu tumoral ou par les cellules environnantes modulent à la fois la croissance tumorale et la réponse immune anti-tumorale. Parmi ces cytokines, la leptine est une protéine sécrétée majoritairement par le tissu adipeux, notamment à proximité du tissu glandulaire mammaire (Zhang, Y. et al. 1994; Woods, S.C. et al. 1998). Notre équipe a récemment démontré que cette adipokine est impliquée dans le développement tumoral mammaire (Jarde, T. et al. 2008a; Jarde, T. et al. 2008b; Jarde, T. et al. 2009). Son récepteur est

également exprimé par les cellules NK (Zhao, Y. et al. 2003). Dans la continuité de ces travaux, les effets de la leptine sur les capacités prolifératives, métaboliques et fonctionnelles des cellules NK ont été caractérisés dans ce projet.

Au niveau du micro-environnement tumoral, la biodisponibilité de bio-molécules est également suspectée de moduler l'activité des cellules NK. En situation de cancer du sein, une déplétion en arginine est rapportée au niveau local et/ou systémique (Visser, Y.L. et al. 2005) du fait d'une consommation accrue de cet acide aminé par l'arginase I exprimée non seulement par les cellules suppressors dérivées des myéloïdes (MSDC) (Serafini, P. et al. 2006; Rodriguez, P.C. and Ochoa, A.C. 2008) mais, aussi par la tumeur (Singh, R. et al. 2000). Cette déplétion induit une inhibition de la prolifération et de l'activité des lymphocytes T (Rodriguez, P.C. and Ochoa, A.C. 2008). Toutefois, peu de travaux se sont intéressés à l'impact d'une telle déplétion sur les cellules NK.

Dans ce contexte, nous avons cherché à identifier les altérations fonctionnelles et métaboliques des cellules NK en situation de stress nutritionnel et de cancer mammaire. Ces travaux s'inscrivent dans la thématique de l'équipe « micro-Environnement CellulaiRE, Immunomodulation et Nutrition » (ECREIN) rattachée à l'Unité de Nutrition Humaine (UNH) UMR 1019 INRA/Université d'Auvergne dont les thèmes de recherche concernent d'une part, les interactions métaboliques et fonctionnelles de la cellule avec son micro-environnement et d'autre part, l'immunomodulation nutritionnelle. Cette thématique de recherche s'inscrit dans les orientations du Centre de Recherche en Nutrition Humaine d'Auvergne (CRNH-A) (axe « tissus hormono-dépendants ») et du programme Procan 2 du Cancéropôle Lyon Auvergne Rhône Alpes (CLARA) (axe B « nutrition, métabolisme, cancer »), en lien avec le Centre de Lutte contre le Cancer (CLCC) Jean-Perrin.

Dans une première partie de rappels bibliographiques, nous avons décrit les cellules immunitaires participant à la vigilance anti-tumorale puis les mécanismes mis en place par les cellules tumorales pour échapper à l'immunosurveillance. Sont rapportées par la suite les données de la littérature concernant l'impact du stress métabolique dans la cancérogenèse et la réponse immune anti-tumorale.

Dans une seconde partie expérimentale, les travaux de recherche originaux sont présentés et discutés. Nous nous sommes tout d'abord intéressés à l'impact *in vivo* d'un régime hypercalorique sur le développement tumoral et l'activité fonctionnelle des cellules NK (Publication n°1). Au cours de ce travail nous avons montré qu'un régime hypercalorique, sans induire de surpoids, stimule la prolifération tumorale mammaire et réduit le nombre ainsi que la cytotoxicité des cellules NK.

Par la suite, nous avons cherché à identifier *in vitro* les altérations fonctionnelles des cellules NK en mimant des conditions retrouvées dans le micro-environnement tumoral telles qu'un enrichissement en leptine (Publication n°2) et une déplétion en arginine (Publication n°3). Ces

investigations ont révélé que des concentrations supra-physiologiques de leptine sont capables de stimuler ou d'inhiber la cytotoxicité des cellules NK selon les cellules cancéreuses mammaires cibles. Par ailleurs, la déplétion en arginine diminue l'activité cytotoxique des cellules NK. Ces variations de l'activité des cellules NK passent notamment par une modulation des capacités sécrétoires ainsi que par une modification de l'expression des acteurs de la cytotoxicité, des récepteurs activateurs et des molécules transmettant le signal activateur. Suite à une discussion et une conclusion générale, des perspectives de recherche seront dégagées.

Ces travaux de thèse dans le cadre de l'Ecole Doctorale des Sciences de la Vie, Santé, Agronomie, Environnement, ont été financés par un Contrat de Projets Etat-Région (CPER 2008) et des Fonds Européens de Développement Régional (FEDER). Ils ont été suivis par le Pr Yves Boirie (UNH UMR 1019 INRA/Université d'Auvergne) et le Pr Pierre Verrelle (EA 3846, CLCC Jean Perrin) dans le cadre du comité de thèse. De plus, ils ont été présentés sous forme de communications orales ou affichées lors de congrès internationaux et nationaux et de journées scientifiques locales.

Partie I Contexte scientifique et problématique

Contexte scientifique et problématique

Les mécanismes fondamentaux de division cellulaire et de réplication de l'ADN peuvent être soumis à des erreurs qui compromettent l'intégrité du génome et peuvent potentiellement aboutir à la formation de cellules tumorales. De nombreuses études révèlent que le cancer est une pathologie multifactorielle au cours de laquelle les cellules somatiques acquièrent de multiples mutations qui empêchent la mise en place des mécanismes contrôlant l'expansion cellulaire (Hanahan, D. and Weinberg, R.A. 2011). La prolifération de cellules tumorales peut être mortelle, néanmoins, le système immunitaire est capable de lutter contre (Vesely, M.D. et al. 2011). Le système immunitaire, inné et adaptatif, intervient dans la reconnaissance des tumeurs malignes en vue de les détruire. L'immunologie des tumeurs est ainsi fondée sur deux concepts essentiels : la surveillance immunitaire des cellules tumorales et les mécanismes d'évasion permettant à la cellule cancéreuse d'échapper à la destruction tumorale.

Erlich P., en 1909, a été l'un des premiers à suggérer que le système immunitaire est capable d'éliminer des cellules transformées, considérées comme étrangères à l'organisme. Cinquante ans après, Thomas L. suggère que la fonction primaire des cellules immunitaires est de protéger les organismes multicellulaires contre les pathologies néoplasiques afin de maintenir l'homéostasie des tissus (Schreiber, R.D. et al. 2011). En parallèle, Burnet F.M., en 1957, a émis l'hypothèse que les cellules somatiques peuvent devenir malignes suite à des mutations génétiques et qu'il est donc nécessaire pour l'évolution d'avoir un système capable d'éliminer ou de détruire ces cellules mutantes potentiellement dangereuses (Schreiber, R.D. et al. 2011). Ces différentes théories sont à l'origine du concept d'immunosurveillance. Celui-ci stipule que le système immunitaire, et notamment les lymphocytes T, jouerait un rôle de surveillance de l'organisme en reconnaissant les cellules néoplasiques comme étrangères et en les éliminant à un stade précoce. Par conséquent, les tumeurs ne peuvent se développer que lorsque les cellules cancéreuses échappent au système immunitaire (Burnet, F.M. 1970). Afin d'étayer ce concept d'immunosurveillance de nombreuses expériences ont suivi. L'immunosuppression induite par thymectomie néonatale ou par injection de sérums anti-lymphocytes provoque une forte susceptibilité au développement de tumeur induite par des virus et accroît l'apparition de lymphomes spontanés (Stutman, O. 1975). Néanmoins, l'incidence des tumeurs chimio-induites et des tumeurs spontanées autre que des lymphomes n'est pas accrue chez ces souris immunodéprimées (Stutman, O. 1975). Ces résultats suggèrent que l'apparition des tumeurs est due à une forte susceptibilité aux agents infectieux tels que les virus. Ces derniers, de part leur stimulation antigénique chronique, induisent une augmentation de la prolifération des lymphocytes et des mutations somatiques et sont également à l'origine des lymphomes (Klein, G. 1973; Stutman, O. 1975). Ces résultats ne permettant pas de prouver ou de réfuter l'hypothèse d'immunosurveillance, cette théorie est restée très controversée.

Tableau 1 : **Susceptibilité des souris immunodéficientes aux carcinogènes**

Souche de souris	Statut immunitaire	Susceptibilité à développer des tumeurs <i>versus</i> souris sauvages
<i>Rag1</i> ^{-/-} ou <i>Rag2</i> ^{-/-}	Absence de LT, LB et NKT	↑ Sarcomes induits par MCA
<i>SCID</i>	Absence de LT, LB et NKT	↑ Sarcomes induits par MCA
<i>Tcrb</i> ^{-/-}	Absence de LTαβ	↑ Sarcomes induits par MCA
<i>Tcrd</i> ^{-/-}	Absence de LTγδ	↑ Sarcomes induits par MCA ↑ Tumeurs de la peau induites par DMBA/TPA
<i>Nude (athymique)</i>	Absence de LT	↑ Sarcomes induits par MCA
<i>Ifngr1</i> ^{-/-}	Insensible à l'IFN-γ	↑ Sarcomes induits par MCA
<i>Ifng</i> ^{-/-}	Absence d'IFN-γ	↑ Sarcomes et tumeurs de la peau induits par MCA ↑ Lymphomes induits par MNU
<i>Stat1</i> ^{-/-}	Insensible à l'IFN-α, β et γ	↑ Sarcomes induits par MCA
<i>Ifnar1</i> ^{-/-}	Insensible à l'IFN-α et β	↑ Sarcomes induits par MCA
<i>Pfp</i> ^{-/-}	Absence de perforine	↑ Sarcomes induits par MCA
<i>Pfp</i> ^{-/-} <i>Ifng</i> ^{-/-}	Absence de perforine et d'IFN-γ	↑ Sarcomes induits par MCA
<i>IL-12α</i> ^{-/-}	Absence d'IL-12	↑ Tumeurs de la peau induites par DMBA/TPA ↑ Lymphomes induits par MNU
<i>IL-12β</i> ^{-/-}	Absence d'IL-12 et d'IL-23	↑ Sarcomes induits par MCA ↓ Tumeurs de la peau induites par DMBA/TPA
Traitement avec un <i>Ac anti-NK1.1</i>	Absence de NK et NKT	↑ Sarcomes induits par MCA
Traitement avec un <i>Ac anti-Asialo-GM1</i>	Absence de NK	↑ Sarcomes induits par MCA
<i>Trail</i> ^{-/-}	Absence de TRAIL	↑ Sarcomes induits par MCA
<i>Tnf</i> ^{ε/-}	Absence de TNF-α	↑ Sarcomes induits par MCA ↓ Tumeurs de la peau induites par DMBA/TPA
<i>Ccl11</i> ^{-/-} <i>IL5</i> ^{-/-}	Absence d'éosinophiles	↑ Sarcomes induits par MCA
<i>IL-10</i> ^{-/-}	Absence d'IL-10	↑ Sarcomes induits par MCA

Abréviations: *Ccl11*, chimiokines (C-C motif) ligand 11 ; DMBA, 7,12 di-méthylbenzo(α)-anthracène ; *GM1*, ganglioside ; *Ifn*, interféron ; *Ifnar1*, récepteur de type 1 de l'IFN ; *Ifngr*, récepteur 1 de l'IFN-γ ; *IL*, interleukine ; LB, lymphocyte B ; LT, lymphocyte T ; MCA, méthylchloroanthrène ; MNU, N-méthyl-N-nitrosourea ; NK, natural killer ; NKT, natural killer T ; *Pfp*, perforine ; *Rag*, recombination activating gene ; *SCID*, severe combined immunodeficient ; *Stat1*, signal transducer and activation of transcription ; *Tcr*, récepteur des cellules T ; *Tnf*, tumor necrosis factor-α ; TPA, 12-O-tétradécanoyl-phorbol-13-acétate ; *Trail*, TNF-related apoptosis-inducing ligand

(D'après Vesely, M.D. et al. 2011)

Le développement de souris déficientes pour des gènes codant pour des protéines essentielles au système immunitaire a provoqué un regain d'intérêt pour le concept d'immunosurveillance (Schreiber, R.D. et al. 2011). En effet, ces modèles animaux ont permis de mettre en évidence l'importance du système immunitaire dans le contrôle de la cancérogenèse. De plus, différents travaux suggèrent que l'immunosurveillance est un processus hétérogène qui requiert l'action d'effecteurs immuns différents selon le type de cellules cancéreuses, le processus de transformation tumorale, la localisation anatomique et la reconnaissance immunologique (**Tableau 1**).

L'immunité innée et l'immunité adaptative sont toutes deux impliquées dans l'immunosurveillance et collaborent pour éliminer les cellules tumorales. Dans cette première partie, nous discuterons des rôles respectifs des effecteurs de l'immunité adaptative et innée dans la réponse immune anti-tumorale mais, également des mécanismes par lesquels les cellules tumorales échappent à la surveillance du système immunitaire.

I) La réponse immune anti-tumorale

I-1 La réponse immune adaptative anti-tumorale

L'immunité adaptative est basée sur la sélection clonale de lymphocytes exprimant à leur surface des récepteurs spécifiques d'un antigène. En effet, au sein de la population lymphocytaire, la spécificité cellulaire n'est représentée que par quelques cellules qui possèdent un site de liaison identique pour un antigène donné. Après contact avec un antigène, les lymphocytes prolifèrent et se différencient soit en cellules effectrices capables de détruire l'antigène, soit en cellules mémoires dont la fonction est d'attendre une nouvelle rencontre avec l'antigène spécifique pour mettre en place une réponse adaptée plus précoce. Les principaux effecteurs de l'immunité adaptative sont les lymphocytes T CD8⁺ (LT CD8) et les lymphocytes T CD4⁺ (LT CD4). Ils reconnaissent respectivement les antigènes tumoraux présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I) ou le CMH de classe II. Le CMH de type I est présent à la surface de toutes les cellules à l'exception des globules rouges alors que le CMH de type II est présent uniquement à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA) (Minden, M.D. and Mak, T.W. 1986).

I-1-1 L'activation de la réponse immune adaptative

Les antigènes tumoraux sont portés par le CMH de classe II des CPA. Lors d'un contact entre un LT et une CPA, un premier signal est transmis au LT *via* la liaison entre son récepteur, le « T cell receptor » (TCR) et les complexes CMH/peptides exprimés sur la CPA. Puis un second signal, appelé signal de co-stimulation, est délivré par la CPA sur laquelle le LT reconnaît son antigène spécifique. Ces deux signaux sont nécessaires pour induire la prolifération et la différenciation des LT naïfs en LT effecteurs.

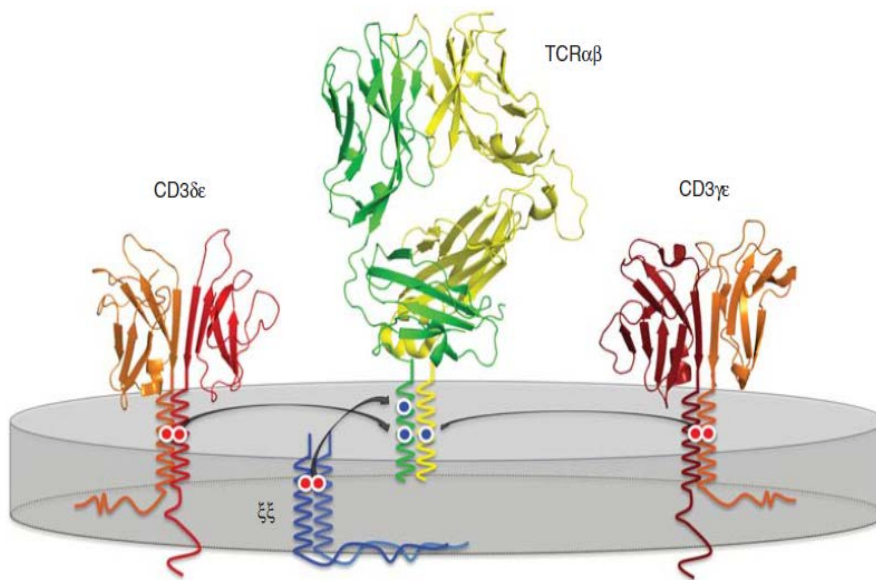


Figure 1 : **Structure du TCR des lymphocytes T**
(D'après Wucherpfennig, K.W. et al. 2010)

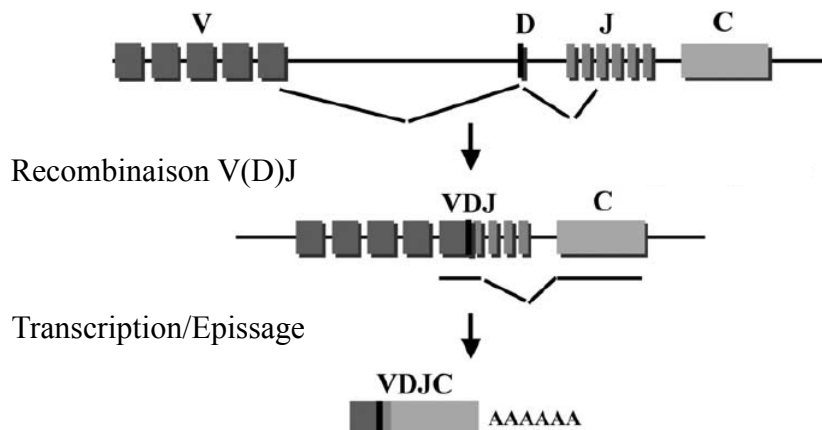


Figure 2 : **Réarrangement du TCR des lymphocytes T**
(D'après Revy, P. et al. 2005).

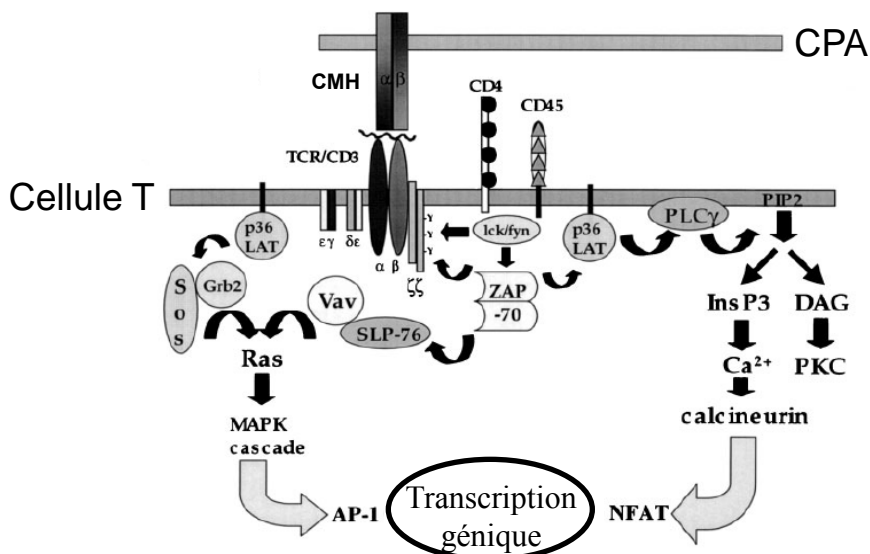


Figure 3 : **Transduction du signal du TCR des lymphocytes T**
(D'après Cope, A.P. 2003)

I-1-1-a La signalisation par le TCR

Les récepteurs T ou TCR sont des hétérodimères formés par l'association de deux chaînes polypeptidiques α et β ou γ et δ . Chacune comporte un domaine variable (V) N-terminal et un domaine constant (C) ancré à la membrane (**Figure 1**). La majorité des lymphocytes T périphériques expriment un TCR $\alpha\beta$. La synthèse d'une chaîne de TCR fonctionnelle nécessite des recombinaisons de segments génétiques lors de la maturation intra-thymique des cellules T. Les réarrangements des domaines variables des gènes codant pour les sous-unités α et γ se font entre une région V et une région J (joining). Pour les sous-unités β et δ , les réarrangements des domaines variables ont lieu entre les régions V, D (diversity) et J (Revy, P. et al. 2005) (**Figure 2**). Ces différentes recombinaisons font intervenir les recombinaisons « recombination activating gene 1 » (RAG1) et RAG2 qui reconnaissent les séquences signal de recombinaison (RSS) situées de part et d'autre des segments V, D et J. Elles clivent l'ADN au niveau des RSS et associent un segment V à un segment D et un segment J assurant ainsi la production d'une unité VDJ fonctionnelle et spécifique (Grawunder, U. and Harfst, E. 2001). Les chaînes $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ du TCR sont associées de manière non covalente aux protéines membranaires du complexe CD3. Celui-ci est composé de trois modules de signalisation dimérique (CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ et $\zeta\zeta$) (**Figure 1**) qui sont phosphorylés lors de l'activation du TCR et permettent ainsi la transmission du signal (Wucherpfennig, K.W. et al. 2010). Le TCR est ainsi constitué de quatre dimères, l'hétérodimère des TCR $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$ détermine la spécificité de la liaison au ligand, tandis que les dimères du CD3 (CD3 $\delta\epsilon$, CD3 $\gamma\epsilon$ et $\zeta\zeta$) sont nécessaires à l'expression des récepteurs des cellules T et à la transduction du signal.

Il existe deux grandes classes de LT qui se différencient par le type de molécules de CMH reconnues *via* leur TCR. Ces LT ont des fonctions différentes et expriment à leur surface des co-récepteurs CD8 ou CD4. Ces derniers sont des glycoprotéines qui se lient aux CMH de classe I pour le CD8 et au CMH de classe II pour le CD4. La reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR induit l'activation *via* le CD3 de plusieurs voies de signalisation dont la voie calcique (Negulescu, P.A. et al. 1994), la voie de la protéine kinase (PK) C (Monks, C.R. et al. 1997) et la voie des « Mitogen-Activated Protein » (MAP) kinases (Cope, A.P. 2003) (**Figure 3**). Ces dernières activent des facteurs de transcription qui induisent l'expression de gènes impliqués dans l'activation et la différenciation lymphocytaire. Néanmoins, ce signal ne peut pas induire à lui seul la prolifération et la différenciation des LT naïfs en LT effecteurs.

I-1-1-b Le signal de co-stimulation

Pour leur activation, les LT naïfs nécessitent un second signal ou signal de co-stimulation non spécifique de l'antigène. Ce signal est déclenché essentiellement par les interactions entre le CD28 de la surface des LT et les membres de la famille des immunoglobulines B7 présents à la surface de la

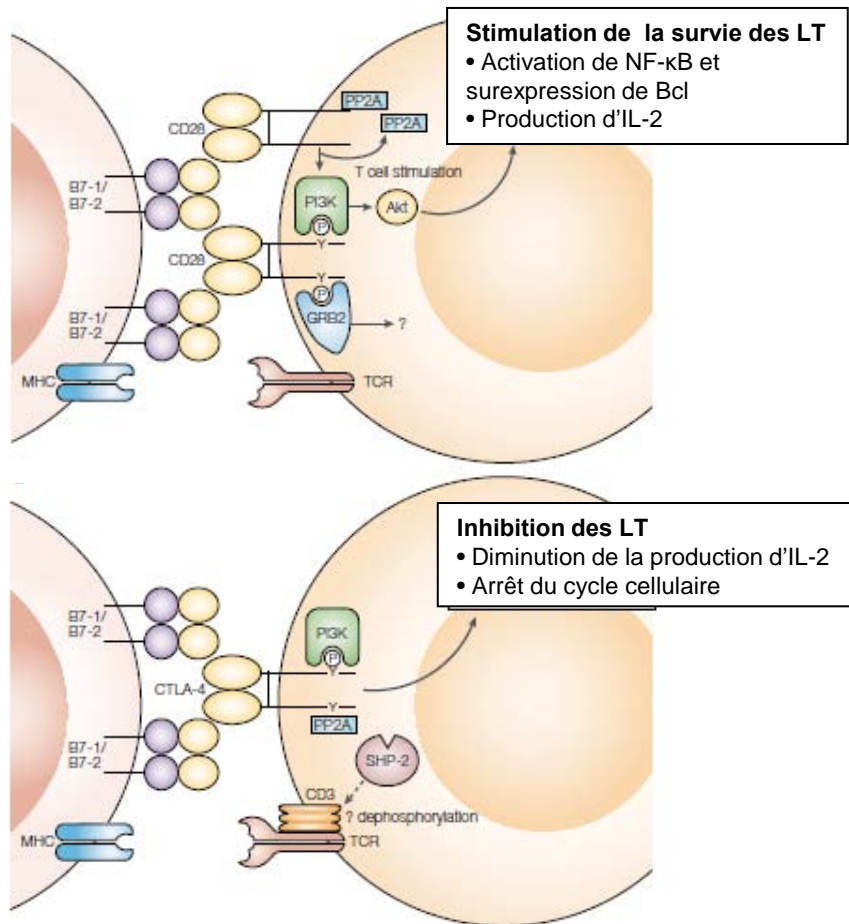


Figure 4 : **Activation des LT naïfs et inhibition des LT activés via les molécules B7**
(D'après Sharpe, A.H. and Freeman, G.J. 2002)

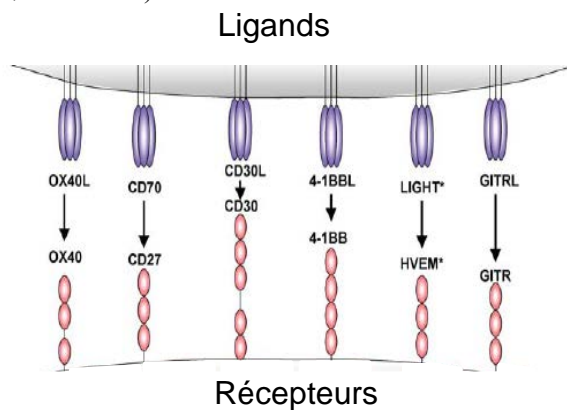


Figure 5 : **Les différentes liaisons TNF/TNFR**
(D'après Watts, T.H. 2005)

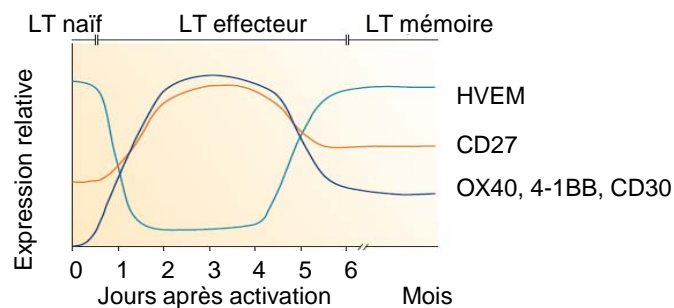


Figure 6 : **Expression des différents TNFR après stimulation en fonction du temps**
(D'après Croft, M. 2003)

CPA. Il peut également être délivré par des molécules de la famille des « Tumor Necrosis Factors » (TNF) et des ligands des cellules NK.

i. Les molécules B7

Les molécules B7 appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Les deux formes les plus caractérisées sont les molécules B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) et sont exprimées constitutivement par les cellules dendritiques, les macrophages et les lymphocytes T et B (Greenwald, R.J. et al. 2005). Les ligands des B7-1 et B7-2 sont le CD28 et le « Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 » (CTLA-4 ou CD152). Le CD28 est constitutivement exprimé par les LT et sa fixation sur les molécules B7 de la CPA engendre un signal en synergie avec le signal du TCR et provoque l'activation des LT naïfs (**Figure 4**) (Sharpe, A.H. and Freeman, G.J. 2002). L'expression du CTLA-4 à la surface des LT est induite par l'activation de la cellule. Le CTLA-4 se fixe sur les molécules B7 avec une affinité supérieure à celle du CD28 et induit un signal inhibiteur dans les LT activés (**Figure 4**) (Sharpe, A.H. and Freeman, G.J. 2002). Les souris *Ctla-4^{-/-}* développent une pathologie mortelle caractérisée par une prolifération lymphocytaire massive. Ceci démontre le rôle essentiel de CTLA-4 pour limiter la prolifération des LT induite par l'antigène et les molécules de stimulation présentées par la CPA (Mandelbrot, D.A. et al. 1999).

ii. Les molécules de la famille des TNFR

Le signal de co-stimulation peut également être délivré par la liaison des récepteurs au « Tumor Necrosis Factor » (TNFR), retrouvés à la surface des LT, à leur ligand le TNF. Plusieurs membres de la famille TNFR/TNF sont capables de jouer un rôle dans la réponse des LT préalablement activés par la liaison TCR/CMH peptide. Ces complexes sont : CD27/CD70, 4-1BB (CD137)/4-1BBL, CD30/CD30L, « Herpes Virus Entry Mediator » (HVEM)/LIGHT, OX40 (CD134)/OX40L et « Glucocorticoid-Induced TNFR family Related » (GITR)/GITRL (Watts, T.H. 2005) (**Figure 5**). Dans une revue en date de 2003, Croft M. propose un modèle dans lequel les fonctions du CD27, du 4-1BB, du CD30, du OX40 et du HVEM sont dépendantes de la chronologie de leur expression et de celle de leur ligand (Croft, M. 2003) (**Figure 6**). De plus, HVEM et CD27 joueraient un rôle important dans la phase précoce de la réponse des cellules T. En effet, durant l'activation des LT, l'expression de HVEM est rapidement réprimée alors que celle de CD27 est accrue, suggérant que HVEM et son ligand ont une fonction importante durant l'initiation de l'activation et que l'interaction CD27/CD70 stimule la survie et la prolifération pendant la phase d'expansion clonale (**Figure 6**). A l'inverse, l'expression d'OX40, du 4-1BB et du CD30 et de leurs ligands est induite uniquement dans les LT et les CPA activés. Par conséquent, les couples OX40/OX40L, 4-1BB/4-1BB et CD30/CD30L semblent jouer un rôle dans la phase tardive de la réponse des cellules T (Croft, M. 2003) (**Figure 6**). De plus, les molécules 4-1BB et OX40 sont

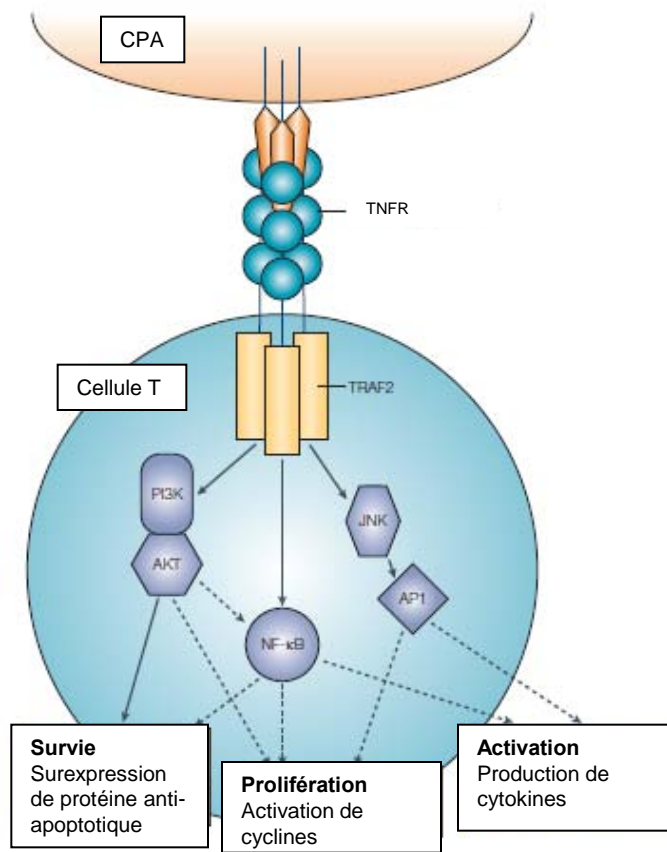


Figure 7 : **Transduction du signal TNF/TFNR**
(D'après Croft, M. 2003)

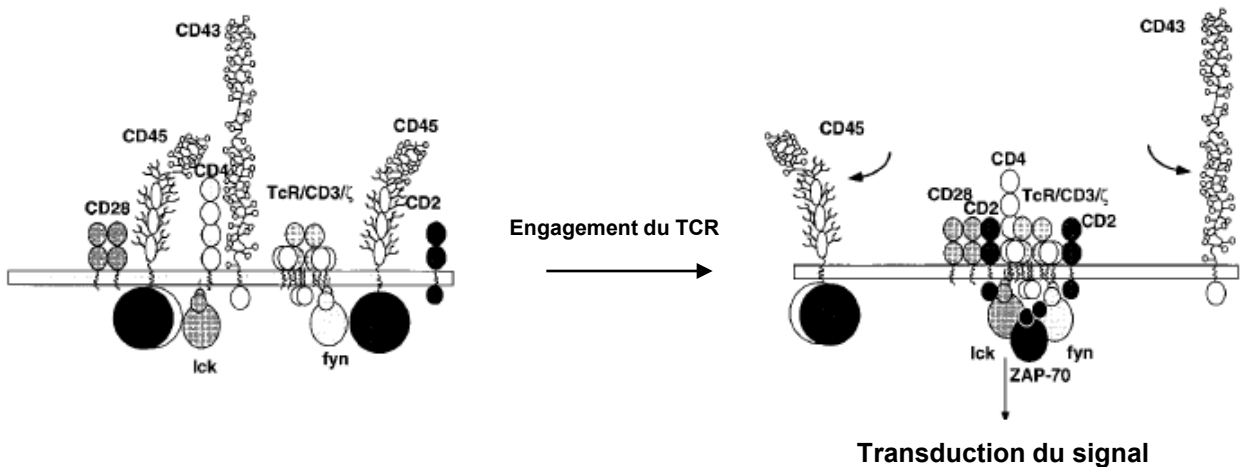


Figure 8 : **Organisation schématique des protéines du TCR avant et après son engagement**
(D'après Shawn, A.S. and Dustin, M.L. 1997)

capables d'induire l'expression de molécules anti-apoptotiques et par conséquent inhiber l'apoptose des LT et contribuer à accroître le pool des LT effecteurs (Rogers, P.R. et al. 2001; Lee, H.W. et al. 2002). La partie intra-cytoplasmique des TNFR est liée aux protéines facteurs « TNFR-Associated » (TRAFs) qui servent d'adaptateurs pour des kinases. La liaison TNFR/TFN induit l'activation *via* les protéines TRAFs de plusieurs voies de signalisation dont la voie de la « Phosphatidylinositol 3-Kinase » (PI3K), la voie « Nuclear Factor-kappa B » (NF-κB) et la voie « JUN N-terminal Kinase » (JNK). Ces voies de signalisation induisent l'expression de gènes impliqués dans la survie, la prolifération et la fonction des LT (Croft, M. 2003) (**Figure 7**).

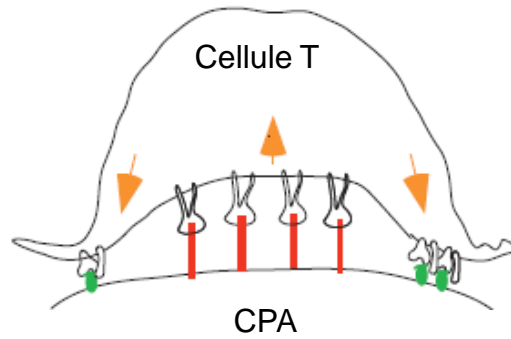
iii. Les ligands des cellules NK

Du fait de l'expression des molécules du CMH de classe II à la surface des cellules NK activées, une interaction directe entre les cellules NK et les LT CD4 a été suggérée (Phillips, J.H. et al. 1984). Des clones de cellules NK sont capables de présenter l'antigène *via* leur CMH de type II aux LT CD4, et induisent ainsi leur prolifération (Roncarolo, M.G. et al. 1991). Les molécules de co-stimulation impliquées dans cette interaction ont été identifiées plus tardivement. Ainsi, les cellules NK activées par l'IL-2, l'IL-12 ou l'IL-15 expriment à leur surface, des molécules de co-stimulation B7-2 impliquées dans l'activation des LT naïfs *via* leur fixation sur le CD28 (Zingoni, A. et al. 2004). De plus, l'activation des récepteurs activateurs CD16 et NKG2D des cellules NK préalablement stimulées par l'IL-2, l'IL-12 ou l'IL-15 induit l'expression de l'OX40L à leur surface. Ainsi, les interactions entre les cellules T et les cellules NK *via* les couples B7/CD28 et OX40/OX40L fournissent les signaux de co-stimulation nécessaires à la prolifération et à la production d'Interféron-γ (IFN-γ) par les LT CD4 (Zingoni, A. et al. 2004). *In vivo*, ces interactions pourraient avoir lieu dans les ganglions lymphatiques inflammés où cohabitent les cellules T et NK (Fehniger, T.A. et al. 2003).

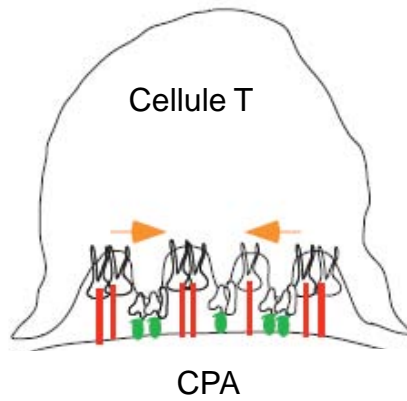
I-1-1-c La synapse immunologique

La première étape de l'activation des LT consiste en la formation d'une synapse immunologique permettant aux LT de se fixer sur les CPA. Bien que l'engagement du TCR soit primordial pour l'activation des LT, cette étape est soumise à de nombreuses contraintes. En effet, certaines glycoprotéines telles que le CD43 et le CD45 peuvent former une barrière stérique empêchant la fixation du TCR au CMH (**Figure 8**) (Shaw, A.S. and Dustin, M.L. 1997). De plus, l'affinité du TCR vis-à-vis du CMH (Lyons, D.S. et al. 1996; Kersh, G.J. et al. 1998) et le nombre de CMH à la surface des CPA sont relativement faibles (Wang, W. et al. 1997). Malgré ces contraintes, une synapse immunologique est capable de se mettre en place en trois étapes : la formation de la jonction, le transport du complexe CMH/peptide et la stabilisation de la structure (**Figure 9**). La première étape débute par la fixation du « Lymphocyte Function-associated Antigen-1 » (LFA-1) sur l'« Intercellular Adhesion Molecule-1 » (ICAM-1). La localisation centrale du complexe ICAM-

1 Formation de la jonction



2 Transport du complexe CMH/peptide



3 Stabilisation de la synapse

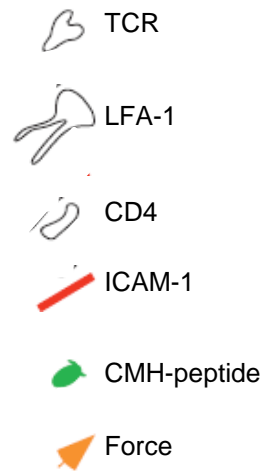
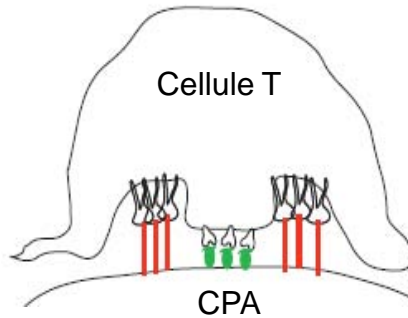


Figure 9 : Représentation schématique de la formation d'une synapse immunologique entre un lymphocyte T (LT) et une cellule présentatrice d'antigène (CPA)
(D'après Grakoui, A. et al. 1999)

1/LFA-1 provoque un effet de pivot permettant ainsi la formation du complexe TCR/CMH peptide aux extrémités (Grakoui, A. et al. 1999) (**Figure 9**). Ensuite, ce complexe est déplacé dans la région centrale, grâce à des mécanismes impliquant l'actine du cytosquelette (Wulfig, C. and Davis, M.M. 1998; Grakoui, A. et al. 1999). Une fois stabilisé en région centrale, le complexe TCR/CMH peptide est entouré de complexes ICAM-1/LFA-1 (Monks, C.R. et al. 1998; Grakoui, A. et al. 1999) (**Figure 9**). Cette ultime structure constitue la synapse immunologique dans laquelle l'interaction entre le TCR et le CMH-peptide est assez stable pour déclencher le signal activateur dans les cellules T naïves.

I-1-2 Acquisitions des fonctions effectrices des LT et rôles dans la réponse immune anti-tumorale

Un LT naïf qui reconnaît un antigène présenté par une CPA et qui reçoit les deux signaux nécessaires à son activation (liaison TCR/CMH et co-stimulation), prolifère et se différencie soit en lymphocyte T cytotoxique (LT CD8) soit en lymphocyte T auxiliaire (LT CD4). Ces deux types cellulaires jouent un rôle dans la réponse immune anti-tumorale.

I-1-2-a Les LT CD8 cytotoxiques

Certaines cellules tumorales expriment à leur surface des antigènes capables d'activer les lymphocytes T (Van Der Bruggen, P. et al. 2002). Les cellules T CD8⁺ cytotoxiques ont la capacité de lyser les CPA dont elles sont spécifiques (Barry, M. and Bleackley, R.C. 2002; Mescher, M.F. et al. 2007). Cette lyse peut être induite par trois mécanismes. Lors du contact entre le TCR du LT CD8 et le complexe CMH/peptide présent à la surface de la cellule tumorale, une réorganisation du cytosquelette des LT CD8 permet d'orienter l'exocytose de granules lytiques vers la cellule cible (Kupfer, A. and Dennert, G. 1984; Yannelli, J.R. et al. 1986). Ces granules contiennent de la perforine capable de former des pores à la surface de la cellule cible *via* lesquels les granzymes atteignent le cytoplasme en vue de déclencher la lyse (Barry, M. and Bleackley, R.C. 2002; Chavez-Galan, L. et al. 2009). Les LT CD8 peuvent également induire l'apoptose des cellules cibles grâce à un mécanisme mettant en jeu la protéine membranaire Fas Ligand (Fas-L) exprimée à leur surface. Cette protéine peut se lier sur le récepteur de mort Fas présent à la surface des cellules cibles et induire l'apoptose en réponse à l'activation de caspases (Barry, M. and Bleackley, R.C. 2002; Chavez-Galan, L. et al. 2009). Enfin, la cytotoxicité des LT CD8 est également dépendante de leur capacité à produire du TNF- α . En effet, le blocage du TNF- α par un anticorps inhibe l'activité cytotoxique des LT CD8 (Barth, R.J., Jr. et al. 1991). Le TNF- α sécrété par les LT CD8, une fois fixé sur son récepteur au niveau de la cellule cible, induit l'apoptose de celle-ci de façon similaire à l'interaction Fas-L/Fas (Smyth, M.J. and Ortaldo, J.R. 1993). Les fonctions effectrices des LT CD8 et des cellules NK passent par les mêmes voies apoptotiques qui seront détaillées ultérieurement.

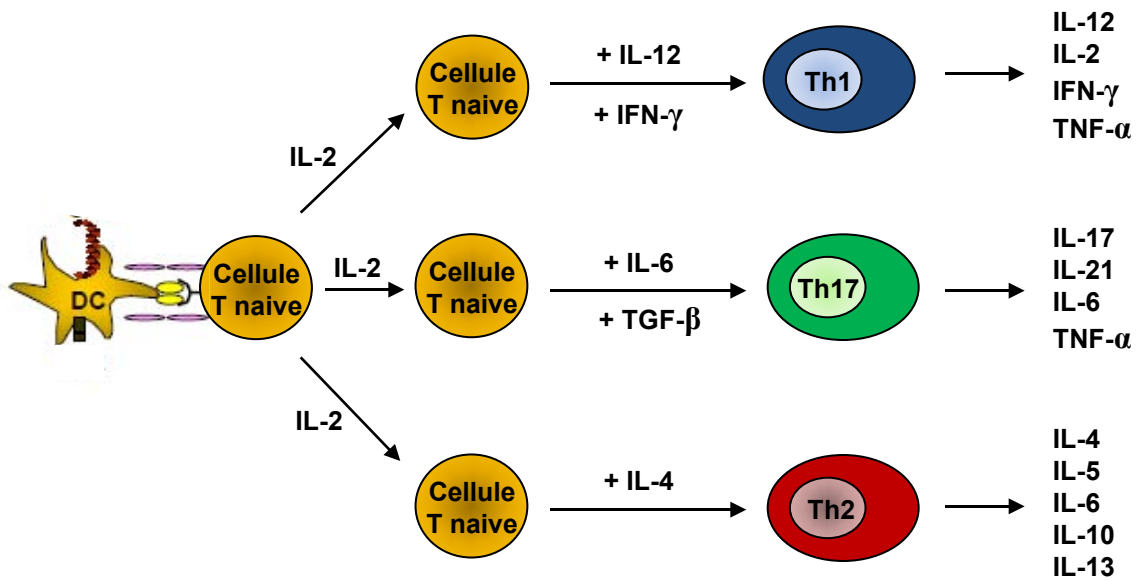


Figure 10 : **Développement et activité sécrétoire des sous-populations lymphocytaires T**
(D'après Cooke, A. 2006)

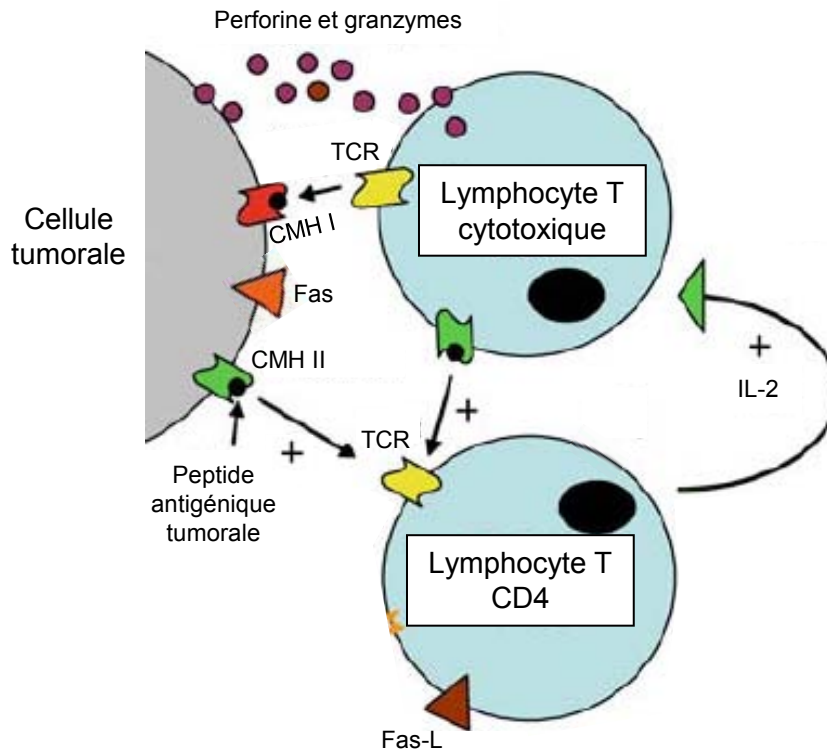


Figure 11 : **Rôles des LT CD4 dans le micro-environnement tumoral**
(D'après Knutson, K.L. and Disis, M.L. 2005)

I-1-2-b Les LT CD4 auxiliaires

Les cellules CD4⁺ auxiliaires ou « helper » jouent un rôle primordial dans la polarisation de la réponse immune. Suite à une interaction avec une CPA activée, le LT CD4 naïf est capable de se différencier en LT CD4 helper 1 (Th1), helper 2 (Th2) ou helper 17 (Th17) (Abbas, A.K. et al. 1996; Tato, C.M. and O'Shea, J.J. 2006). Cette différenciation est multifactorielle et dépend non seulement de l'environnement cytokinique (Cooke, A. 2006) mais, aussi du type de CPA (Duncan, D.D. and Swain, S.L. 1994) et des molécules de co-stimulation qu'elles expriment (Palmer, E.M. and van Seventer, G.A. 1997). Ainsi, en présence d'IL-12 et d'IFN- γ , les LT CD4 se différencient en cellules de type Th1. Les LT de type Th2 sont induits par l'IL-4 (Abbas, A.K. et al. 1996; Romagnani, S. 1997) et ceux de type Th17 se développent en présence de TGF- β et d'IL-6 (Cooke, A. 2006) (**Figure 10**).

Ces sous classes de LT CD4 se différencient également par le profil de cytokines qu'elles sécrètent. Ainsi, les lymphocytes de type Th1 produisent de l'IL-12, de l'IFN- γ , de l'IL-2, et du TNF- α (Abbas, A.K. et al. 1996; McGhee, J.R. 2005) alors que les lymphocytes de type Th2 sécrètent de l'IL-4, 5, 6, 10 et 13 (Abbas, A.K. et al. 1996) et les lymphocytes de type Th17 de l'IL-17, de l'IL-21, de l'IL-6 et du TNF- α (Langrish, C.L. et al. 2005; Bettelli, E. et al. 2007). Les cellules de type Th1 déclenchent une réponse à médiation cellulaire favorisant la différenciation des LT en LT CD4 cytotoxiques. De plus, de part leur sécrétion de TNF- α et d'IFN- γ permettant le recrutement d'effecteurs cellulaires de l'inflammation, les LT de type Th1 sont également impliqués dans la réaction inflammatoire (Mosmann, T.R. et al. 1986; Romagnani, S. 1995). Les LT de type Th2 participent à la réponse immune humorale en favorisant la différenciation des lymphocytes B en cellules productrices d'anticorps et activent les éosinophiles (Romagnani, S. 1999). Les LT de type Th17 recrutent les neutrophiles et sont associées à la réponse inflammatoire chronique des pathologies auto-immunes (Bettelli, E. et al. 2007; Iwakura, Y. et al. 2008).

Les LT CD4 participent également à la réponse anti-tumorale. En effet, ces cellules peuvent induire l'expression de Fas à la surface des cellules tumorales et provoquer la lyse de ces cellules *via* la voie Fas/Fas-L (Schattner, E.J. et al. 1996). Les cellules de type Th1 sont capables de lyser les cellules tumorales par la voie perforine/granzyme dépendante (Echchakir, H. et al. 2000). Par ailleurs, les LT CD8 cytotoxiques présents au niveau du site tumoral sont activés suite à un contact avec des cellules de type Th1 ou *via* l'IL-2 sécrétée par ces dernières (Knutson, K.L. and Disis, M.L. 2005) (**Figure 11**). Les LT CD4 peuvent recruter sur le site tumoral des cellules effectrices telles que les cellules NK et les macrophages (Greenberg, P.D. 1991; Hung, K. et al. 1998).

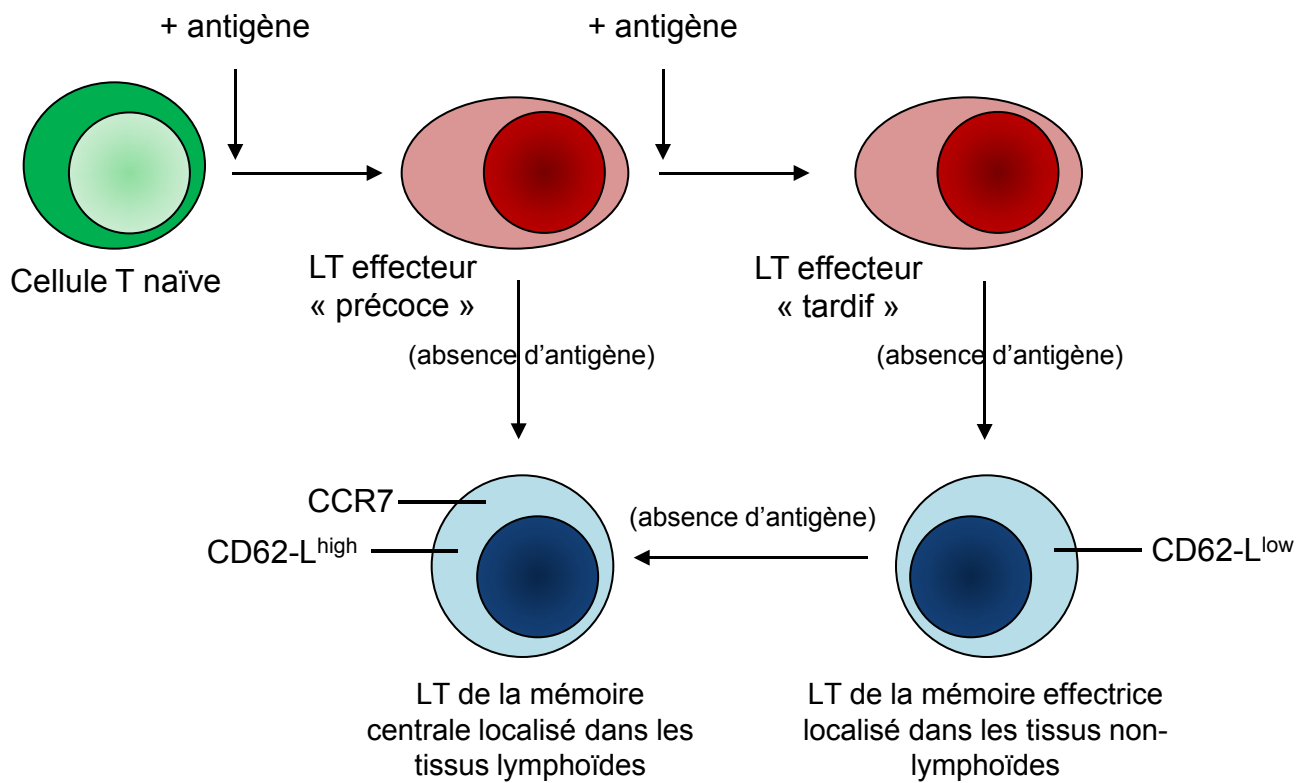


Figure 12 : **Différenciation des LT mémoires**
 (D'après Kaeck, S.M. et al. 2002)

I-1-3 La mémoire immunitaire associée aux LT

Le système immunitaire adaptatif est capable d'établir un état de mémoire antigénique spécifique. Les cellules mémoires survivent après l'élimination du pathogène alors que la plupart des cellules T effectrices (90%) meurent par apoptose. Il s'agit des LT CD4 et des LT CD8, dotés d'une durée de vie relativement longue, ils sont capables de générer des réponses secondaires plus rapides et plus massives de part leur différenciation en cellules effectrices et leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (Kaech, S.M. et al. 2002). Ces LT deviennent des cellules mémoires *via* des modifications moléculaires qui les rendent résistantes à l'apoptose consécutive de l'activation lymphocytaire (Jameson, S.C. 2002; Masopust, D. et al. 2004). Deux types de cellules mémoires se distinguent par le niveau d'expression des molécules de surface CD62-L et CCR7 : les LT de la mémoire effectrice (LT EM) et les LT de la mémoire centrale (LT CM) (Kaech, S.M. et al. 2002) (**Figure 12**). Les LT CM expriment fortement le CD62-L et à un degré moindre le CCR7. Ils sont localisés majoritairement dans les organes lymphoïdes mais, aussi dans la moelle osseuse, le sang et la rate (Lefrançois, L. 2006). Lorsqu'ils sont réactivés, ils peuvent rejoindre la circulation, perdre le CCR7 et devenir des effecteurs mémoires (Kaech, S.M. et al. 2002). Les LT EM n'expriment pas le CCR7 et sont faiblement positifs au CD62-L. Présents dans la rate, le sang et les tissus non lymphoïdes, ils répondent rapidement à l'antigène en produisant des molécules effectrices (Seder, R.A. and Ahmed, R. 2003). En effet, les LT EM expriment constitutivement les ARNm des gènes codant pour l'IFN- γ , la perforine et les granzymes. La synthèse de ces protéines est activée par le contact avec l'antigène et leur production est beaucoup plus rapide que dans les cellules naïves (Kaech, S.M. and Ahmed, R. 2003). Puisque le cancer présente les caractéristiques physiopathologiques des maladies chroniques et évolutives, il n'est pas surprenant d'observer des lymphocytes T mémoires dans les tumeurs. Il a été suggéré que les LT EM pourraient être directement impliqués dans le contrôle de la progression cancéreuse. Leurs capacités cytotoxique et cytokinique pourraient être les armes pour le contrôle de la progression tumorale et l'invasion métastatique au niveau du site tumoral primaire (Pages, F. et al. 2009; Mlecnik, B. et al. 2011). De plus, après suppression d'une tumeur par chirurgie, les LT EM ont la capacité d'avoir en mémoire les antigènes rencontrés ultérieurement et de déclencher une réponse immune plus rapide après un nouveau contact avec les cellules cancéreuses dans le sang, la cavité péritonéale, la moelle osseuse ou les nœuds lymphatiques (Sallusto, F. et al. 2004; Mlecnik, B. et al. 2011).

I-1-4 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) reconnaissent, *via* leur récepteur le « B-cell receptor » (BCR), l'antigène à l'état natif, c'est-à-dire non dégradé par une CPA (DeFranco, A.L. et al. 1995). Les lymphocytes B sécrètent les immunoglobulines et sont également capables d'internaliser un pathogène

pour le présenter par leur CMH de classe II aux autres cellules immunitaires (Rodriguez-Pinto, D. 2005). Les CPA présentent l'antigène aux LB dans les organes lymphoïdes secondaires. Ainsi activés, les LB forment des clones pour se différencier en plasmocytes. Ces derniers migrent vers les sites inflammatoires et sécrètent des immunoglobulines, spécifiques de l'antigène, et des cytokines. L'interaction directe entre une cellule B et un antigène peut également suffire à leur différenciation en plasmocyte. Toutefois, l'activation de la cellule B requiert la présence d'un LT. Après élimination du pathogène, certains LB, issus des LB ayant subi l'expansion clonale, assurent une fonction mémoire (Defrance, T. et al. 2002; McHeyzer-Williams, L.J. and McHeyzer-Williams, M.G. 2005). Ils sont nécessaires pour une activation optimale des LT CD4 et des LT CD8 durant la réponse anti-tumorale. En effet, chez des souris déplétées en LB grâce à un anticorps (CD20), le développement du mélanome B16 et les métastases sont plus importants (DiLillo, D.J. et al. 2010). De plus, l'induction des LT mémoires et la sécrétion des cytokines inflammatoires par les LT CD4 et les LT CD8 sont inhibées chez ces souris. L'activation et la prolifération des LT CD8 cytotoxiques spécifiques de la tumeur sont également réduits. A l'inverse, d'autres études montrent que le développement de lymphome chez des souris déplétées en LB par un anticorps (CD19 ou CD20) est réduit et la survie des souris est prolongée (Bouaziz, J.D. et al. 2007; Minard-Colin, V. et al. 2008). Par conséquent, les LB peuvent avoir un rôle positif ou négatif dans l'immunité anti-tumorale.

I-2 La réponse immune innée anti-tumorale

Les cellules impliquées dans l'immunité innée constituent la première barrière pour éliminer les cellules anormales, en particulier les cellules tumorales. Cette réponse innée anti-tumorale est assurée par différentes cellules effectrices : les lymphocytes Natural Killer T (NKT), les lymphocytes $T\gamma\delta$ ($LT\gamma\delta$), les cellules dendritiques (DC), les cellules NK, les monocytes/macrophages, les polynucléaires neutrophiles et les éosinophiles. Dans cette partie, nous présenterons les principales cellules qui contribuent à la surveillance immunitaire innée à savoir les cellules NKT, les lymphocytes $T\gamma\delta$, les DC et plus particulièrement les cellules NK.

I-2-1 Les lymphocytes NKT

Les cellules NKT sont des lymphocytes T possédant des fonctions de l'immunité adaptative et des caractéristiques des cellules NK dont l'expression du CD56. Ces cellules expriment un TCR et reconnaissent des antigènes glycolipidiques du type α -galactosylcéramide (tel que α -Galcer) non pas par l'intermédiaire des molécules de CMH classique mais, *via* la molécule CD1d. Ces cellules sécrètent des cytokines immunorégulatrices comme l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-4 (Godfrey, D.I. and Berzins, S.P. 2007). Leur rôle dans la réponse anti-tumorale a été démontré dans des modèles murins en réponse à des injections de α -Galcer ou d'IL-12 (Morita, M. et al. 1995; Nakagawa, R. et al. 2000). Cependant, les cellules NKT ne jouent pas un rôle cytotoxique direct mais, plutôt celui d'activateur de

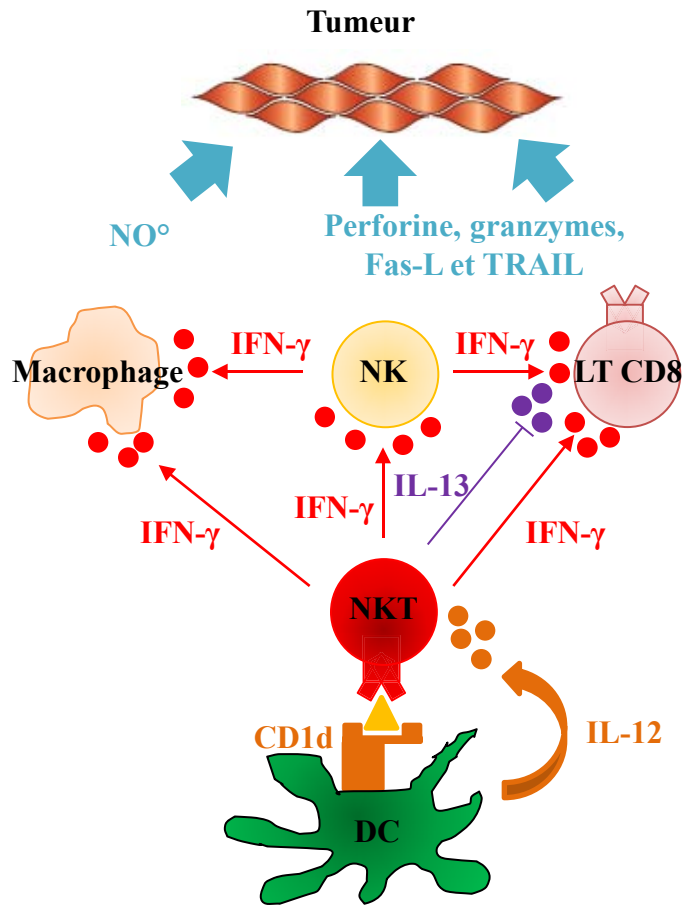


Figure 13 : **Actions stimulatrice et inhibitrice des NKT sur la réponse immune anti-tumorale**
(D'après Terabe, M. and Berzofsky, J.A. 2008)

cellules NK, des LT CD8 cytotoxiques et des macrophages capables de lyser des cellules tumorales. Ainsi, les cellules NKT activées par l'IL-12 ou l' α -Galcer sécrètent de l'IFN- γ qui stimule les cellules NK, les LT CD8 et les macrophages (Takeda, K. et al. 2000; Terabe, M. and Berzofsky, J.A. 2008) (**Figure 13**). Par ailleurs, des souris déficientes en cellules NKT développent davantage de tumeurs induites par le méthylcholanthrene, suggérant un rôle des NKT dans la vigilance anti-tumorale (Smyth, M.J. et al. 2001b). Elles sont également capables d'inhiber la réponse anti-tumorale dépendante des LT CD8 *via* la production d'IL-13 (Terabe, M. and Berzofsky, J.A. 2008) (**Figure 13**). En effet, selon l'affinité du ligand, l'environnement cytokinique, la présence de signaux de co-stimulation ou le type de CPA, les cellules NKT stimulent ou inhibent la réponse anti-tumorale (Arase, H. et al. 1994; Hayakawa, Y. et al. 2001; Leite-De-Moraes, M.C. et al. 2001).

I-2-2 Les lymphocytes T gamma-delta

Les LT $\gamma\delta$, issus de la lignée lymphoïde, expriment à leur surface un TCR constitué d'un hétérodimère $\gamma\delta$ lui-même associé à deux molécules de CD3 (Casetti, R. and Martino, A. 2008). Retrouvés à hauteur de 2 à 5% au niveau circulant, ils sont abondants dans les tissus en contact direct avec le milieu extérieur comme la peau, les poumons et l'épithélium intestinal où ils représentent 20% des lymphocytes intra-épithéliaux (Xiong, N. and Raulet, D.H. 2007). Ces lymphocytes reconnaissent l'antigène par le TCR $\gamma\delta$ et ceci indépendamment d'une présentation par les molécules du CMH (Morita, C.T. et al. 1995). Ils lysent les cellules cibles notamment grâce au système perforine/granzymes (Kaufmann, S.H. et al. 1993). Munis de capacités sécrétoires de cytokines de type Th1 (Morita, C.T. et al. 1991), ils se répartissent en deux principales sous-populations qui diffèrent par la nature des régions variables du TCR : les lymphocytes V γ 9V δ 2 et les lymphocytes V γ xV δ 1 (Triebel, F. and Hercend, T. 1989). Ceux qui expriment les régions variables V γ xV δ 1 pourraient intervenir comme première ligne de défense contre certaines infections et tumeurs (Ferrarini, M. et al. 2002). En effet, ils reconnaissent les molécules « CMH I chain-related protein A et B » (MIC A et B) exprimées à la surface des cellules stressées telles que des cellules tumorales (Groh, V. et al. 1999). Le récepteur activateur NKG2D présent à la surface des LT γ x δ 1 est capable de se fixer sur MIC A et MIC B et de déclencher la lyse des cellules tumorales (Bauer, S. et al. 1999). Les LT exprimant un TCR V γ 9V δ 2 constituent le sous-type de LT $\gamma\delta$ le plus décrit chez l'homme (Triebel, F. and Hercend, T. 1989; Casetti, R. and Martino, A. 2008). Ils sont capables de reconnaître des antigènes solubles non peptidiques appelés phospho-antigènes (Poupot, M. and Fournie, J.J. 2004). Ils sont sur-exprimés par certaines tumeurs et induisent une activation des LT γ 9 δ 2 qui provoquent la lyse des cellules cancéreuses (Todaro, M. et al. 2009; D'Asaro, M. et al. 2010). Comme pour les lymphocytes T γ x δ 1, les cellules LT γ 9 δ 2 peuvent également induire l'apoptose des cellules tumorales *via* le récepteur NKG2D (Rincon-Orozco, B. et al. 2005). De plus, des souris déficientes pour la

chaîne δ développent davantage de tumeurs spontanées, suggérant l'implication des deux sous-types de LT $\gamma\delta$ dans la vigilance anti-tumorale (Girardi, M. et al. 2001).

I-2-3 Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (Dendritic Cells, DC)) sont des CPA qui jouent un rôle primordial dans l'orchestration des différents acteurs lymphocytaires impliqués dans la réponse immune. Elles permettent de faire le lien entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Banchereau, J. and Steinman, R.M. 1998; Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. 2001). Les DC immatures (iDC), localisées dans les tissus périphériques, exercent des rôles de sentinelles du système immunitaire en capturant un large spectre d'antigènes bien qu'elles aient une faible capacité à présenter l'antigène. En présence de certains signaux environnementaux et en particulier cytokiniques (TNF- α , IL-1 β), les DC vont passer du stade immature au stade mature. Cette transition se traduit par une perte de la capacité à capturer les antigènes et une forte stimulation de l'expression des molécules du CMH I et II et des molécules de co-stimulation (Jensen, P.E. 2007). Les DC matures sont alors capables de dégrader et d'apprêter les antigènes sur leur CMH I et II afin de les présenter aux LT. Cette interaction se déroule dans les organes lymphoïdes secondaires où les elles migrent après leur activation (Trombetta, E.S. and Mellman, I. 2005; Faure-Andre, G. et al. 2008). Les antigènes « endogènes » et les antigènes issus de pathogènes retrouvés dans le cytosol sont présentés aux LT CD8 en association avec des molécules du CMH de classe I, alors que les antigènes « exogènes » ou extracellulaires sont apprêtés avec des molécules du CMH de type II en vue d'être présentés aux LT CD4 (Vyas, J.M. et al. 2008; Neeffjes, J. et al. 2011).

Les DC peuvent être classées en deux types : les DC myéloïdes (mDC) et les DC plasmocytoïdes (pDC). Les premières se développent à partir de progéniteurs myéloïdes alors que les secondes dérivent de progéniteurs lymphoïdes (Arpinati, M. et al. 2003; Banchereau, J. et al. 2003). L'ensemble des caractéristiques décrites ci-dessus sont retrouvées dans les deux types cellulaires. Cependant, les pDC produisent davantage d'interférons de type I que les cellules mDC (Siegal, F.P. et al. 1999). De plus, les pDC expriment plus faiblement les molécules du CMH que les mDC, suggérant que les premières seraient moins efficaces que les secondes pour stimuler les lymphocytes T (Villadangos, J.A. and Young, L. 2008).

I-2-4 Les cellules NK

Les cellules NK sont de larges cellules granulaires actrices du système immunitaire inné. Elles représentent environ 10 à 15% des lymphocytes circulants et constituent ainsi la troisième population majeure de lymphocytes (Trinchieri, G. 1989). Elles jouent un rôle important dans l'immunité de l'hôte de par leurs capacités à induire rapidement la lyse des cellules infectées ou transformées et à

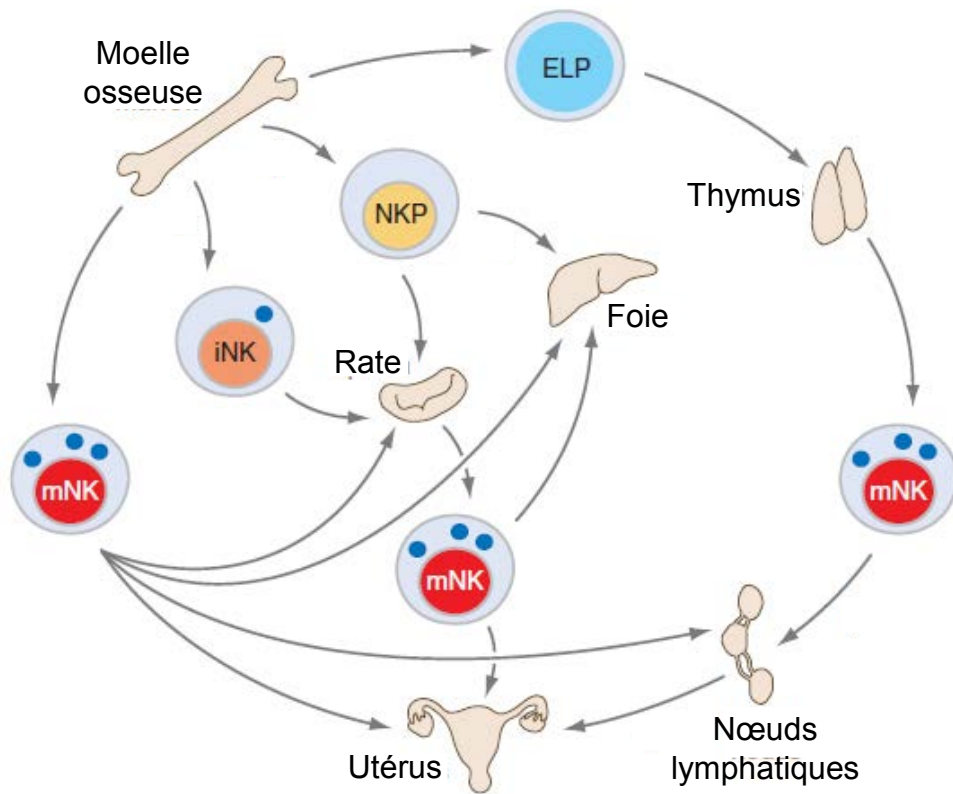


Figure 14 : **Développement et migration des cellules NK**
 ELP : progéniteur lymphoïde des cellules NK ; iNK : cellule NK immature ; mNK : cellule NK mature ; NKP : précurseur des cellules NK
 (D'après Di Santo, J.P. 2006)

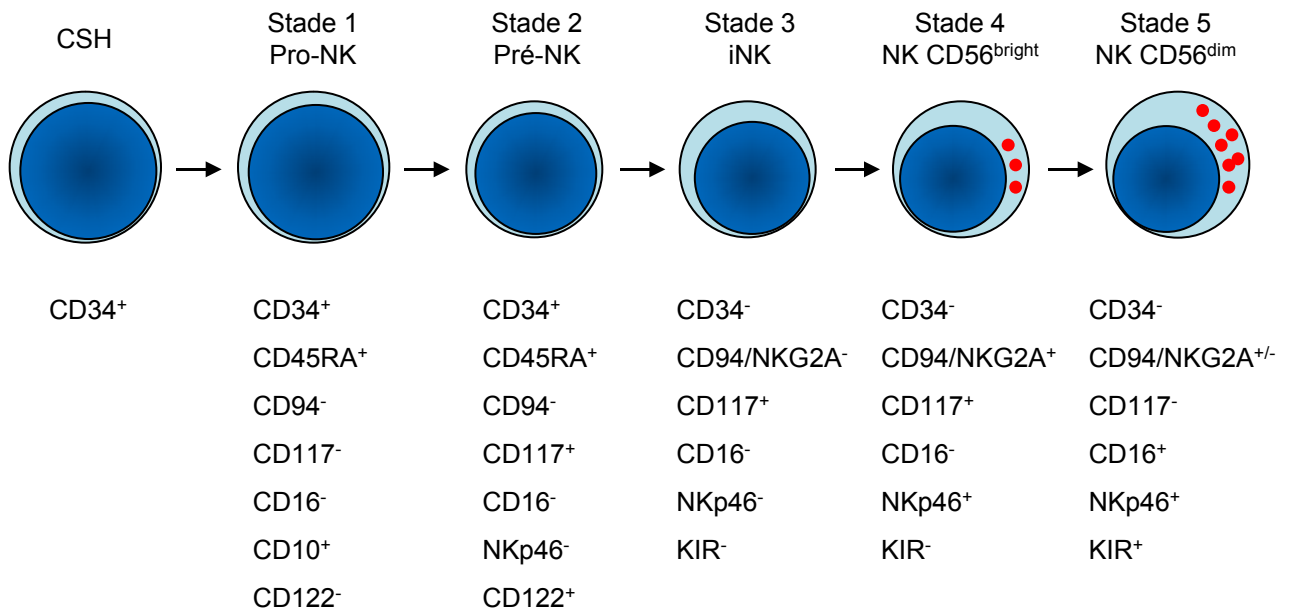


Figure 15 : **Modèle de différenciation des cellules NK humaines *in vivo***
 CSH : cellule souche hématopoïétique ; iNK : cellule NK immature ; Pré-NK : précurseur des cellules NK ; Pro-NK : progéniteur des cellules NK
 (D'après Caligiuri, M.A. 2008)

produire des cytokines et des chimiokines capables d'orienter la réponse immune adaptative. *In vivo*, les cellules NK ont une durée de vie limitée (temps de $\frac{1}{2}$ vie : 7 à 10 jours) et doivent donc être continuellement régénérées afin de maintenir l'homéostasie (Yokoyama, W.M. et al. 2004). Chez l'adulte, les cellules NK se développent principalement dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques. Durant leur développement, elles sont éduquées afin d'être tolérantes vis-à-vis du Soi et acquérir différents récepteurs.

I-2-4-a Le développement des cellules NK

Le développement des cellules NK se déroule principalement dans la moelle osseuse (Yokoyama, W.M. et al. 2004). En effet, des cellules souches hématopoïétiques CD34⁺ co-cultivées, *in vitro*, en présence de cellules stromales de la moelle osseuse se différencient en cellules NK cytotoxiques (Miller, J.S. et al. 1992). Néanmoins, des intermédiaires du développement des cellules NK sont capables de migrer vers les tissus périphériques où ils pourront également se différencier pour atteindre leur maturation (Di Santo, J.P. 2006; Freud, A.G. et al. 2006) (**Figure 14**). Toutes les étapes de la différenciation des cellules NK ne sont pas connues. Toutefois, un modèle de développement des cellules NK humaines, *in vivo*, en cinq stades semble se dessiner (**Figure 15**) (Caligiuri, M.A. 2008).

i. Stade 1 : les cellules pro-NK

Les cellules souches hématopoïétiques génèrent des progéniteurs myéloïdes (Akashi, K. et al. 2000) et lymphoïdes (Kondo, M. et al. 1997) communs dont les cellules pro-NK (progéniteur-NK) (Galy, A. et al. 1995). En effet, dans certaines conditions de culture, les cellules pro-NK peuvent se différencier en lymphocytes T ou en cellules dendritiques myéloïdes, suggérant l'existence d'un progéniteur commun (Freud, A.G. et al. 2006). Outre la moelle osseuse, les cellules pro-NK se trouvent également dans les tissus lymphoïdes secondaires où elles peuvent se différencier (Freud, A.G. et al. 2005; Freud, A.G. et al. 2006). Elles se caractérisent par l'expression du CD34, du CD45RA et du CD10 et l'absence d'expression du CD94, du CD117 et du CD122 (Freud, A.G. et al. 2006). L'absence du CD122 (IL-2/IL-15R β) rend les cellules pro-NK non réactives à l'IL-15 et permet de les distinguer des cellules pré-NK (précurseur-NK).

ii. Stade 2 : les cellules pré-NK

Les cellules pro-NK se différencient en cellules pré-NK lorsqu'elles acquièrent le CD122. Des études ont montré que, dans la moelle osseuse, cette différenciation est dépendante des ligands flt3 et c-kit, de l'IL-6 et de l'IL-7 (Yu, H. et al. 1998; Miller, J.S. et al. 1999) alors que dans les tissus lymphoïdes secondaires, elle nécessite uniquement de l'IL-3, de l'IL-7 et du ligand flt3 (Freud, A.G. et al. 2006). Les cellules pré-NK des tissus lymphoïdes secondaires se caractérisent par la présence des CD34, CD45RA, CD117 et l'absence du CD94 (Freud, A.G. et al. 2006). Outre leur différenciation en

Tableau 2 : **Liste non exhaustive des clusters de différenciation**

CD	Autre nom	Expression cellulaire	Fonctions
CD1d		DC	Présentation antigène du type α -Galcer
CD2		LT, NK	Adhésion et activation des LT
CD4		LT	Activation des LT
CD7		NK	Co-stimulation
CD8		LT	Récepteur du CMH I
CD9		Sous-population NK	Adhésion
CD10		Pro-NK	Métalloendopeptidase
CD11b	Intégrine α M	MSDC, monocyte	Adhésion
CD11c	Intégrine α X	NK, monocyte	Adhésion
CD14	LPS-R	Macrophage	Activation
CD16		NK	ADCC
CD19		LB	Signalisation
CD20		LT, LB	Activation et prolifération des LB
CD25	IL-2R α	LT, LB, NK, monocyte	Signalisation de l'IL-2R
CD27		LT	Co-stimulation
CD28		NK	Co-stimulation
CD30		LT	Co-stimulation
CD34		CSH	Adhésion
CD43		LT	Inhibition de l'adhésion
CD44		NK	Adhésion
CD45		LT	Inhibition de l'adhésion
CD45RA		Pro et Pré-NK, LT naïf	Signalisation
CD49b	Intégrine α 2	NK	Adhésion
CD49e	Intégrine α 5	NK	Adhésion
CD56	N-CAM	NK	Adhésion
CD62-L	L-selectine	Leucocytes	Adhésion
CD69		NK	Activation
CD70		LT	Co-stimulation
CD71	Transferrine-R	LT, monocyte	Activation
CD80	B7-1	DC	Co-stimulation
CD85	LIR ou ILT	NK	Activation ou inhibition
CD86	B7-2	DC	Co-stimulation
CD94		LT, NK	Activation ou inhibition
CD95	Fas	LT, NK	Apoptose
CD95L	Fas-L ou CD178	Cellule tumorale, DC, LT	Apoptose
CD103	Intégrine α E	Sous-population NK	Adhésion
CD117		CSH	Développement
CD122	IL-2R β	LT, LB, NK, monocyte	Signalisation de l'IL-2R et de l'IL-15R
CD132	IL-2R γ	LT, LB, NK, monocyte	Signalisation de l'IL-2R et de l'IL-15R
CD134	OX40	LT	Activation des LT
CD137	4-1BB	LT	Co-stimulation
CD152	CTLA-4	LT	Inhibition de l'activation de LT
CD153	CD30L	LT	Co-stimulation
CD158	KIR	NK	Activation ou inhibition
CD161		NK	Activation
CD178	Fas-L ou CD95L	Cellule tumorale, DC, LT	Apoptose
CD244	2B4	NK	Activation
CD314	NKG2D	NK, LT	Activation
CD335	NKp46	NK	Activation
CD336	NKp44	NK	Activation
CD337	NKp30	NK	Activation

Abréviations: ADCC, antibody-dependent cellular cytotoxicity ; CD, cluster de différenciation ; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité ; CSH, cellule souche hématopoïétique ; CTLA-4, Cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 ; DC, cellule dendritique ; IL, interleukine ; ILT, immunoglobulin like transcripts ; LB, lymphocyte B ; LIR, leucocyte immunoglobuline like receptor ; LPS, lipopolysaccharide ; LT, lymphocyte T ; MSDC, myeloid-derived suppressor cell ; N-CAM, neural cell adhesion molecule ; NK, natural killer ; Pré, précurseur ; Pro, progéniteur

cellules NK, les cellules pré-NK peuvent également se différencier en cellules dendritiques myéloïdes (Freud, A.G. et al. 2006). Par conséquent, la réponse à l'IL-2/IL-15 n'est pas forcément synonyme d'un engagement dans la lignée NK (**Tableau 2**).

iii. Stade 3 : les cellules NK immatures

Contrairement aux cellules pro et pré-NK, les cellules NK immatures s'engagent uniquement dans la lignée NK. En effet, la co-culture de cellules NK immatures avec des cellules T autologues, issues des tissus lymphoïdes secondaires, induit la différenciation des cellules NK immatures en cellules NK matures CD56^{bright} (stade 4) (Freud, A.G. et al. 2006). De plus, de nombreux antigènes associés aux autres lignées tels que le TCR, le CD19, le CD14 et le CD86 retrouvés respectivement sur les cellules T, sur les cellules B, sur les monocytes/macrophages et sur les cellules dendritiques, sont absents (Freud, A.G. and Caligiuri, M.A. 2006) des cellules NK immatures. Ces dernières, expriment à des taux variables des antigènes et des récepteurs retrouvés dans les cellules NK matures dont le CD2, le CD7, le CD56, le CD161, le 2B4 et le NKp44 (Freud, A.G. and Caligiuri, M.A. 2006). Néanmoins, elles ne sont pas capables de produire de l'IFN- γ et de lyser les cellules cibles déficientes en CMH de classe I (Trinchieri, G. 1989; Freud, A.G. et al. 2006). En effet, certains récepteurs exprimés par les cellules NK matures tels que le CD94/NKG2, le NKG2D, le NKp46, le CD16 et les KIRs ne sont pas retrouvés sur les cellules NK immatures (Freud, A.G. and Caligiuri, M.A. 2006). Les cellules NK immatures, les plus abondantes dans les tissus lymphoïdes secondaires, sont des cellules intermédiaires du développement des cellules NK (Hughes, T. et al. 2010). Des études rapportent que les cellules NK immatures des tissus lymphoïdes secondaires expriment l'ARNm de l'IL-22 et de l'IL-26 et produisent de l'IL-22 (Cupedo, T. et al. 2009; Hughes, T. et al. 2009). Ces cellules stimulées, *ex vivo*, avec du phorbol myristate acétate (PMA), de l'ionomycine et de l'IL-2, produisent également du « granulocyte-macrophage colony-stimulating factor » (GM-CSF) (Freud, A.G. et al. 2006). De plus, les cellules NK immatures, générées *in vitro* à partir de progéniteurs hématopoïétiques du sang de cordon ombilical et soumises à de fortes doses d'IL-2, produisent de l'IL-13, du TNF α et du GM-CSF (Loza, M.J. et al. 2002) et sont capables de lyser des cellules Jurkat *via* l'expression du « tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand » (TRAIL) (Zamai, L. et al. 1998). Néanmoins, les cellules NK immatures fraîchement isolées des tissus lymphoïdes secondaires ne présentent pas les mêmes caractéristiques et cela suggère une différence majeure entre les cellules NK immatures *in vivo* et celles générées *in vitro* (Freud, A.G. et al. 2006).

Une sous-population de cellules NK immatures, localisée dans les tissus lymphoïdes secondaires et située à proximité de cellules dendritiques produisant de l'IL-1 β et de l'IL-15, possède à la surface le récepteur de l'IL-1 (IL-1R^{hi} iNK). Ces cellules nécessitent une exposition constante à l'IL-1 β pour ne pas se différencier et prolifèrent en réponse à l'IL-1 β et l'IL-15 sécrétées par les cellules dendritiques. En absence d'IL-1 β , une grande partie des cellules IL-1R^{hi} iNK se différencie en

cellules NK matures (Hughes, T. et al. 2010). Ces résultats démontrent le rôle majeur de l'IL-1 β dans l'homéostasie des cellules IL-1R^{hi} iNK et suggèrent l'implication des cellules dendritiques dans la régulation de l'expansion des cellules IL-1R^{hi} iNK au sein des tissus lymphoïdes secondaires.

iv. Stade 4 : les cellules NK CD56^{bright}

Les cellules NK CD56^{bright} représentent 75 à 95% des cellules NK des tissus lymphoïdes secondaires (Fehniger, T.A. et al. 2003; Ferlazzo, G. et al. 2004b) alors qu'elles constituent seulement 10% des cellules NK circulantes (Cooper, M.A. et al. 2001a; Caligiuri, M.A. 2008). Au niveau périphérique, les cellules NK CD56^{bright} expriment les récepteurs CD94/NKG2A, NKp46, CD117 et CD122. Elles n'expriment pas le récepteur KIR et le CD16 (Cooper, M.A. et al. 2001b; Jacobs, R. et al. 2001). Cependant, elles possèdent à leur surface des récepteurs de chimiokines tels que le CCR7 et le CXCR3 et de nombreuses molécules d'adhésion dont le CD2, le CD11c, le CD44 et le CD49e qui leur permettent de migrer vers les tissus lymphoïdes secondaires (Campbell, J.J. et al. 2001; Cooper, M.A. et al. 2001a). Les cellules NK CD56^{bright}, retrouvées dans les tissus lymphoïdes secondaires, expriment les récepteurs CD94/NKG2A, NKG2D, NKp46 et CD122 et ne possèdent pas le CD117, le CD33 ni le CD127 (Freud, A.G. and Caligiuri, M.A. 2006; Freud, A.G. et al. 2006).

D'un point de vue fonctionnel, les cellules NK CD56^{bright} circulantes ou dans les tissus lymphoïdes secondaires, sont peu cytotoxiques du fait de leur contenu en granules lytiques relativement faible mais, sont tout de même capables de lyser les cellules cibles *via* la perforine et Fas-ligand (Fas-L) (Cooper, M.A. et al. 2001a; Jacobs, R. et al. 2001; Freud, A.G. et al. 2006). Elles sécrètent majoritairement de l'IFN- γ et selon les conditions de stimulation, elles peuvent également produire du TNF- α , du GM-CSF, de l'IL-10 et de l'IL-13 (Cooper, M.A. et al. 2001a). Néanmoins, certaines cellules CD56^{bright}, présentes dans les tissus lymphoïdes secondaires, n'expriment pas la perforine et ne produisent pas d'IFN- γ , suggérant une étape de maturation supplémentaire (Freud, A.G. et al. 2006).

v. Stade 5 : les étapes de maturation des cellules NK

Au niveau circulant, deux sous-populations majeures de cellules NK se différencient selon le niveau d'expression du CD56 : les cellules CD56^{bright} et les cellules CD56^{dim} (Cooper, M.A. et al. 2001a). Les cellules NK CD56^{dim} présentent faiblement le CD56 alors que les cellules CD56^{bright} l'expriment fortement. Contrairement aux cellules NK CD56^{bright}, les cellules NK CD56^{dim} expriment le KIR et le CD16, sont très cytotoxiques du fait de leur abondance en granules lytiques, prolifèrent peu et produisent peu de cytokines (Cooper, M.A. et al. 2001a; Cooper, M.A. et al. 2001b; Jacobs, R. et al. 2001). Elles représentent 90% des cellules CD56⁺ de la moelle osseuse, du sang et de la rate alors que les cellules NK CD56^{bright} constituent 90% de ces cellules dans les nœuds lymphatiques et le thymus (Fehniger, T.A. et al. 2003; Ferlazzo, G. et al. 2004b).

Depuis la découverte de ces deux populations, la question fût de savoir si les cellules NK CD56^{bright} étaient les précurseurs des cellules NK CD56^{dim} ou si les deux populations étaient issues de deux précurseurs hématopoïétiques différents. En effet, le phénotype et les propriétés fonctionnelles des deux populations laissent penser que les cellules NK CD56^{bright} sont les précurseurs des cellules NK CD56^{dim}.

La maturation pourrait passer par une sous-expression du CD56 et l'acquisition du CD16 et de KIR (Andre, P. et al. 2000). Cependant, les cellules NK CD56^{bright} produisent davantage de cytokines et possèdent des répertoires aux récepteurs de chimiokines et de molécules d'adhésion différents de ceux des cellules CD56^{dim} (Campbell, J.J. et al. 2001; Cooper, M.A. et al. 2001a). Ceci pourrait suggérer que les deux populations soient issues de deux précurseurs distincts. Néanmoins, différentes études confirment l'hypothèse selon laquelle les cellules CD56^{bright} sont les précurseurs des cellules CD56^{dim} semble la plus probable. En effet, les cellules NK CD56^{bright} possèdent des télomères plus courts (Romagnani, C. et al. 2007), expriment le CD117 comme les précurseurs hématopoïétiques (Matos, M.E. et al. 1993) et certaines d'entre elles ne contiennent pas de granules lytiques (Lanier, L.L. et al. 1986) suggérant un stade moins mature que les cellules CD56^{dim}. Une étude récente décrit des cellules NK intermédiaires entre les cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim} qui présentent une densité variable du CD94 (Yu, J. et al. 2010). La culture, *in vitro*, de cellules CD34⁺ en présence d'IL-2 ou d'IL-15 conduit principalement à la génération de cellules NK CD56^{bright} (Lotzova, E. et al. 1993; Mrozek, E. et al. 1996) et des cellules CD56^{bright} circulantes cultivées avec des fibroblastes se différencient en cellules CD56^{dim} possédant les mêmes caractéristiques que les cellules CD56^{dim} du sang (Chan, A. et al. 2007). Cette différenciation s'opère également *in vivo* où le transfert de cellules CD56^{bright} dans des souris BALB/c Rag2^{-/-}γc^{-/-} traitées avec de l'IL-15 humaine liée de façon covalente à l'IL-15Rα ou dans des souris NOD-SCID aboutit à des cellules NK CD56^{dim} (Chan, A. et al. 2007; Huntington, N.D. et al. 2009). De plus, après transplantation de cellules CD34⁺ chez l'homme, les cellules NK CD56^{bright} dérivées des précurseurs du donneur apparaissent avant les cellules CD56^{dim} (Shilling, H.G. et al. 2003; Vitale, C. et al. 2004).

Même si la plupart des études démontrent une différenciation des cellules NK CD56^{bright} en cellules NK CD56^{dim}, une étude décrit les cellules CD56^{bright} comme des cellules CD56^{dim} activées et non immatures (Loza, M.J. and Perussia, B. 2004). Les cellules NK CD56^{dim} circulantes cultivées en présence d'IL-12 ont une expression du CD56, du CD161, des molécules d'adhésions CD2, CD244 et CD62L et des récepteurs activateurs NKp46 augmentée et une expression du CD16 diminuée, leur conférant ainsi un phénotype de cellules NK CD56^{bright}. En accord avec leur phénotype de cellules activées, les cellules CD56^{bright} produisent d'avantage d'IFN-γ et de TNF-α après activation par l'IL-12 et l'IL-2 associée à d'autres stimuli tels que le complexe PMA/ionomycine ou des cellules tumorales (Loza, M.J. and Perussia, B. 2004). De plus, la culture de cellules NK CD56^{dim} avec du

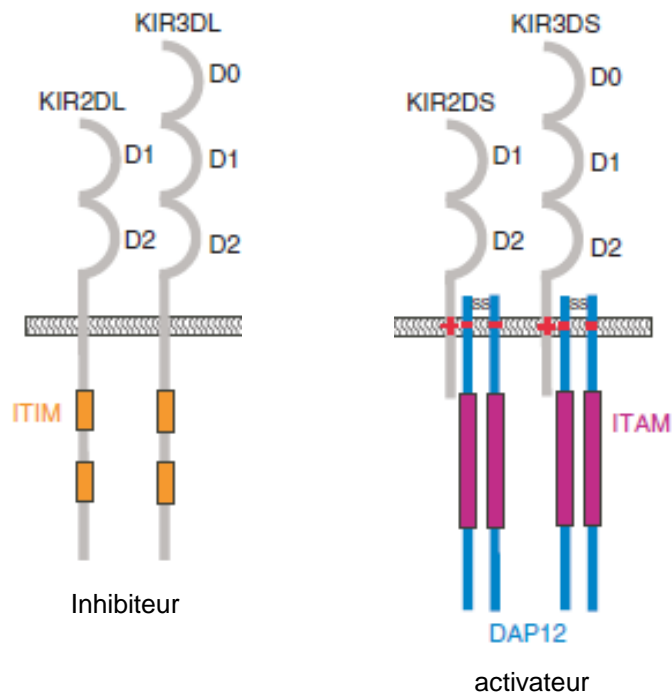


Figure 16 : **Structure des KIR inhibiteurs et activateurs**
(D'après Campbell, K.S. and Purdy, A.K. 2011)

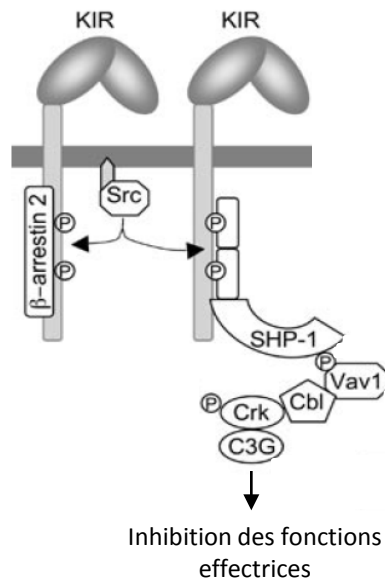


Figure 17 : **Voie de signalisation des KIR inhibiteurs**
(D'après Watzl, C. and Long, E.O. 2010)

TGF- β induit leur différenciation en cellules NK CD56^{superbright} (CD16⁻, CD9⁺, CD103⁺ et KIR⁺) (Keskin, D.B. et al. 2007). Cependant le phénotype de ces dernières est comparable à celui des cellules NK retrouvées dans la muqueuse utérine qui constituent une population totalement différentes des cellules NK CD56^{bright} circulantes (Koopman, L.A. et al. 2003).

I-2-4-b Les récepteurs des cellules NK

L'activité des cellules NK est en permanence régulée par des récepteurs membranaires, capables d'inhiber ou d'activer leurs fonctions. Cet équilibre entre signaux activateurs et inhibiteurs permet aux cellules NK de lyser de préférence les cellules infectées par un virus ainsi que les cellules transformées. La discrimination des cellules saines du Soi et du non-Soi ou du Soi altéré est dirigée par des récepteurs capables d'interagir avec les molécules du CMH de classe I et d'autres récepteurs de ligands mal connus. Les différents récepteurs sont répartis en trois grandes familles : 1) la superfamille des immunoglobulines (Ig), 2) la superfamille des lectines de type C et 3) les « Natural Cytotoxicity Receptors » (NCR). Les cellules NK possèdent également des récepteurs de cytokines et de chimiokines.

i. Les récepteurs de la superfamille des Ig

- Les «killer immunoglobulin-like receptors» (KIR)

Les récepteurs KIR aussi appelés CD158 sont codés par 14 gènes polymorphiques (KIR2DL1-5, KIR3DL1-3, KIR2DS1-5 et KIR3DS1) situés sur le chromosome 19 humain en position 19q13.4 et constituent avec les gènes ILT/LIR le « Leucocyte Receptor Cluster » (LCR) (Wende, H. et al. 1999; Martin, A.M. et al. 2002). Plus précisément, les récepteurs KIR sont des glycoprotéines transmembranaires de type I qui contiennent 2 ou 3 domaines extracellulaires Ig-Like permettant de les différencier en 2 sous-familles : les KIR2D et les KIR3D (Colonna, M. and Samaridis, J. 1995; D'Andrea, A. et al. 1995). Ils possèdent également des domaines cytoplasmiques longs (L) ou courts (S) caractérisant leurs formes inhibitrices ou activatrices respectivement (Moretta, A. et al. 1995; Biassoni, R. et al. 1996; Lanier, L.L. 2005). Les KIR à domaines cytoplasmiques longs (KIR2DL et KIR3DL) contiennent un ou deux motifs dénommés «immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs » (ITIM) (Campbell, K.S. and Purdy, A.K. 2011) (**Figure 16**). Suite à la liaison entre les KIR inhibiteurs et les molécules du CMH de classe I de la cellule cible, les séquences ITIM sont phosphorylées par des tyrosines kinases de la famille Src. Cette phosphorylation provoque la fixation sur les ITIM de la β -arrestine 2 et facilite ainsi le recrutement de tyrosines phosphatases (SHP-1 ou SHP-2) induisant l'inhibition des fonctions effectrices des cellules NK (Burshtyn, D.N. et al. 1997; Long, E.O. 2008; Yu, M.C. et al. 2008; Watzl, C. and Long, E.O. 2010) (**Figure 17**). En revanche, les récepteurs KIR à domaines intracellulaires courts (KIR2DS et KIR3DS) ne possèdent pas de motif ITIM mais, sont pourvus dans leur domaine transmembranaire d'un acide aminé chargé, la lysine. Ce

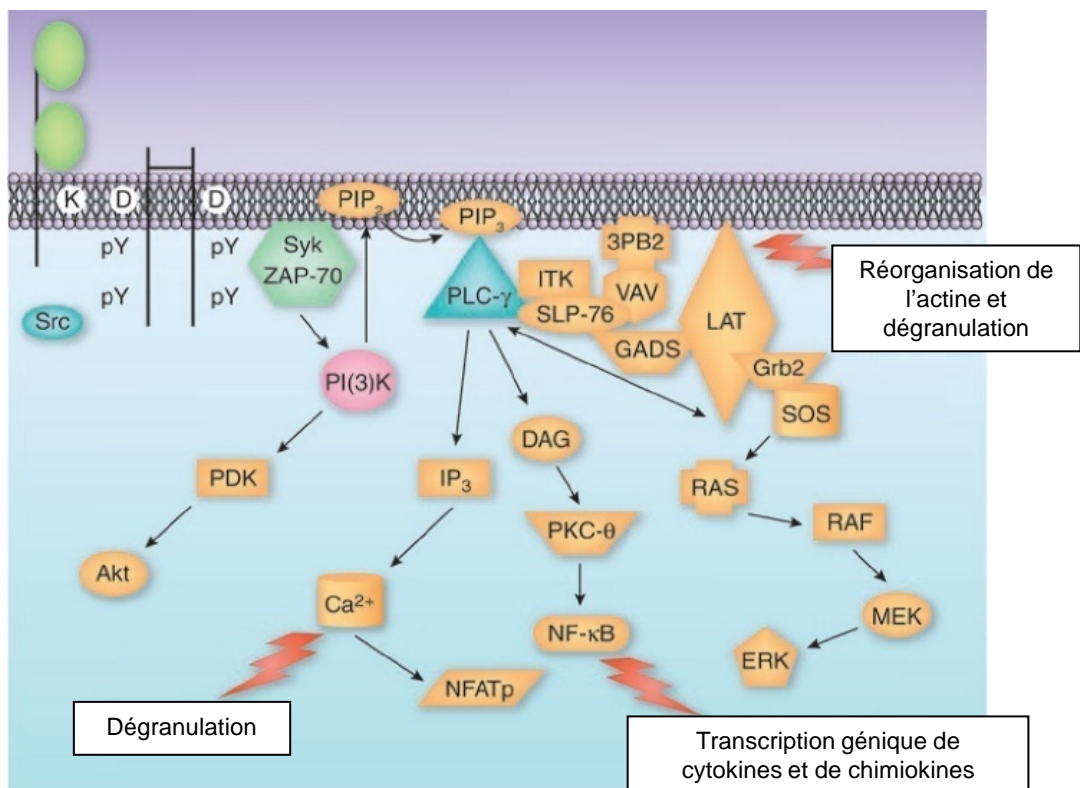


Figure 18 : **Voie de signalisation des KIR activateurs**
(D'après Lanier, L.L. 2008)

dernier est nécessaire à la fixation de la protéine adaptatrice « DNAX-activated polypeptide » de 12 kDa (DAP12) aussi appelée « killer cell-activating receptor-associated polypeptide » (KARAP) qui contient des motifs « immunoreceptor tyrosine-based activating motifs » (ITAM) (**Figure 16**). Après engagement des récepteurs KIR activateurs, ces derniers sont phosphorylés par des tyrosines kinases de la famille Src. D'autres tyrosines kinases sont alors recrutées telles que la « spleen tyrosine kinase » (Syk) et/ou la « ζ -associated protein kinase » de 70 kD (ZAP-70). Elles induisent une cascade de signalisation qui aboutit à la dégranulation de la perforine et des granzymes et à la transcription de gènes codant pour des cytokines et des chimiokines (Wu, J. et al. 2000; Lanier, L.L. 2008) (**Figure 18**).

Les récepteurs KIR reconnaissent les allotypes classiques des molécules du CMH de classe I appelés HLA-A, HLA-B et HLA-C. La discrimination de cette liaison est déterminée par des éléments de séquences spécifiques au sein des molécules HLA. Ainsi, les récepteurs inhibiteurs KIR2DL1, KIR2DL2 et KIR2DL3 sont capables de fixer les molécules HLA-C. Cependant, l'allotype HLA-C est divisé en deux groupes en fonction des acides aminés présents en position 77 et 80. En effet, à ces emplacements, le groupe 1 (HLA-C1) possède respectivement une asparagine et une lysine alors que le groupe 2 (HLA-C2) dispose d'une sérine et d'une asparagine. Cette spécificité permet aux récepteurs KIR2DL1 de se lier aux allotypes HLA-C2 et aux récepteurs KIR2DL2 et KIR2DL3 et de fixer les allotypes HLA-C1 (Biassoni, R. et al. 1995; Mandelboim, O. et al. 1996). De plus, le récepteur KIR2DL2 possède une affinité plus importante que KIR2DL3 pour les allotypes HLA-C1, ce qui lui confère un pouvoir inhibiteur supérieur (Moesta, A.K. et al. 2008). Le récepteur inhibiteur KIR3DL1 reconnaît un motif Bw4 exprimé par 40% des allotypes HLA-B et quelques allotypes HLA-A (Gumperz, J.E. et al. 1995). La présence d'isoleucine ou de thréonine en position 80 du motif Bw4, lui confère respectivement une forte ou une faible affinité pour KIR3DL1 (Cella, M. et al. 1994; Carr, W.H. et al. 2005). Le récepteur inhibiteur KIR3DL2, quant à lui, est capable de se lier aux allotypes HLA-A3 et HLA-A11 et ces interactions pourraient être modulées par la présence de certains peptides (Dohring, C. et al. 1996; Hansasuta, P. et al. 2004). Les ligands des récepteurs inhibiteurs KIR2DL5 et KIR3DL3 n'ont pas encore été identifiés.

Contrairement aux récepteurs KIR inhibiteurs, les fonctions et les ligands des récepteurs KIR activateurs ont été peu étudiés. La forte homologie entre les domaines extracellulaires des KIR inhibiteurs et activateurs suggèrent des spécificités communes de ligands. Cependant, les études montrent que les récepteurs KIR activateurs peuvent soit ne pas se fixer aux molécules HLA, soit se lier avec une affinité inférieure aux récepteurs KIR inhibiteurs correspondants (Vales-Gomez, M. et al. 1998; Stewart, C.A. et al. 2005). Par exemple, alors que le récepteur inhibiteur KIR2DL1 et le récepteur activateur KIR2DS1 diffèrent seulement de 7 acides aminés au niveau de leur domaine extracellulaire, le premier a une affinité pour HLA-C2 plus importante que le second (Winter, C.C. et

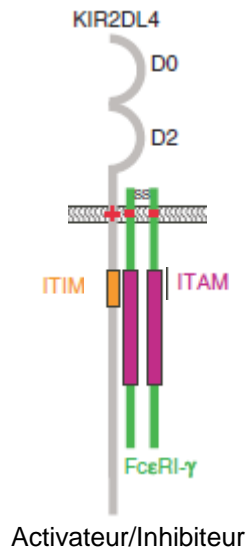
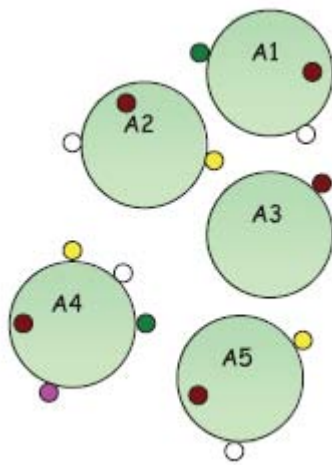


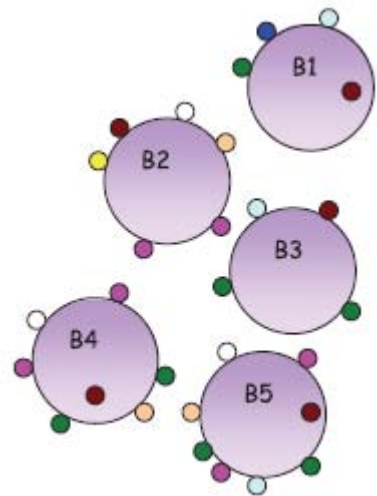
Figure 19 : **Structure des récepteurs KIR2DL4**
 (D'après Campbell, K.S. and Purdy, A.K. 2011)

al. 1998). De même, les récepteurs KIR2DL2 et KIR2DL3, tous deux inhibiteurs, se fixent à HLA-C1. Néanmoins, le récepteur activateur KIR2DS2, dont le domaine extracellulaire diffère respectivement de celui des récepteurs KIR2DL2 et KIR2DL3 par 3 ou 4 acides aminés, ne se lie pas à HLA-C1. Au sein du récepteur KIR2DS2, la conversion de la tyrosine en position 45 par une phénylalanine, retrouvée dans les récepteurs KIR2DL2 et KIR2DL3, permet à KIR2DS2 de se fixer à HLA-C1 (Winter, C.C. et al. 1998). Le domaine extracellulaire du récepteur activateur KIR3DS1 possède plus de 95% d'homologie avec celui du récepteur inhibiteur KIR3DL1. Néanmoins, des études contradictoires ne permettent pas d'affirmer que HLA-Bw4 est le ligand de KIR3DS1 (O'Connor, G.M. et al. 2007; Kulkarni, S. et al. 2008). Le récepteur activateur KIR2DS4 se lie avec une faible affinité aux allotypes HLA-C1, HLA-C2 et HLA-A11 (Graef, T. et al. 2009). Le ligand du récepteur activateur KIR2DS3 n'a pas encore été identifié. Cependant, une étude récente suggère que le récepteur KIR2DS3 pourrait être retenu dans la cellule et par conséquent ne pas être exprimé à la surface des cellules NK (VandenBussche, C.J. et al. 2009). La fixation d'un anticorps anti-KIR sur le récepteur activateur KIR2DS5 provoque la transduction d'un signal activateur mais, le ligand physiologique reste à déterminer (Della Chiesa, M. et al. 2008).

Le récepteur KIR2DL4 est particulier car, d'une part, il est exprimé uniquement sur les cellules NK CD56^{dim} (Goodridge, J.P. et al. 2003) et, d'autre part, il possède à la fois deux domaines intracellulaires dont un long avec un motif ITIM et un court avec un résidu arginine chargé (**Figure 19**) (Faure, M. and Long, E.O. 2002; Yusa, S. et al. 2002). La substitution de la lysine par l'arginine pourrait expliquer l'utilisation de la protéine adaptatrice FcεRIγ dotée de motifs ITAM au lieu de la protéine DAP12 (Kikuchi-Maki, A. et al. 2005). La phosphorylation des motifs ITAM par des tyrosines kinases de la famille des Src induit le recrutement des tyrosines kinases Syk et/ou ZAP-70 relayant ainsi un signal activateur (Wu, J. et al. 2000; Lanier, L.L. 2008) (**Figure 18**). Les fonctions effectrices des cellules NK induites par le récepteur KIR2DL4 peuvent également être indépendantes du résidu arginine chargé. En effet, la mutation de l'arginine chargé, par une glycine, inhibe la fixation de FcεRIγ et par conséquent l'activité cytotoxique des cellules NK. Néanmoins, la production de cytokines *via* les voies de signalisation MAPKs et NF-κB est maintenue (Miah, S.M. et al. 2008). Malgré la présence d'un motif ITIM fonctionnel, la liaison entre un anticorps anti-KIR et le récepteur KIR2DL4 induit la production d'IFN-γ par les cellules NK au repos et déclenche une faible cytotoxicité et la sécrétion d'IFN-γ par les cellules NK activées par de l'IL-2 (Rajagopalan, S. et al. 2001; Kikuchi-Maki, A. et al. 2005). En ce qui concerne l'activité inhibitrice du récepteur KIR2DL4, le domaine ITIM phosphorylé par des tyrosines kinases de la famille Src recrute les tyrosines phosphatases SHP-2 qui déclenchent un signal inhibiteur (Faure, M. and Long, E.O. 2002; Yusa, S. et al. 2002). Le seul ligand connu pour ce récepteur est HLA-G, molécule exprimée par les trophoblastes fœtaux s'implantant dans la déciduale maternelle au cours de la grossesse (Moreau, P. et al. 1999;



Volontaire A



Volontaire B

Génotype des KIR	Fréquence d'expression (% de cellule NK)
2DL1	50
2DL3	36
3DL1	5
3DL2	63
2DL4	100
2DS4	0

Génotype des KIR	Fréquence d'expression (% de cellule NK)
2DL1	14
2DL3	80
3DL1	60
3DL2	53
2DS1	12
2DS3	26
2DS5	34
2DL4	100

Figure 20 : **Diversité des KIR à la surface des cellules NK selon les individus**
(D'après Gardiner, C.M. 2008)

Tableau 3 : **Haplotypes des récepteurs KIR les plus représentés dans la population humaine**

Haplotype	KIR inhibiteur	KIR activateur
A	2DL1, 2DL3, 3DL1, 3DL2, 3DL3	2DS4, 2DL4
B	2DL1, 2DL2, 3DL1, 3DL2, 3DL3	2DS2, 2DS3, 2DS4, 2DL4

(D'après Purdy, A.K. and Campbell, K.S. 2009)

Ponte, M. et al. 1999), les monocytes activés (Yang, Y. et al. 1996; Moreau, P. et al. 1999), les cellules épithéliales thymiques (Crisa, L. et al. 1997) et certaines cellules tumorales (Carosella, E.D. et al. 2000). La fixation de HLA-G sur le récepteur KIR2DL4 provoque la sécrétion par les cellules NK de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α et IFN- γ) et de médiateurs pro-angiogéniques tel que le « vascular endothelial growth factor » (VEGF) (Rajagopalan, S. and Long, E.O. 1999; Goodridge, J.P. et al. 2009).

Les cellules NK d'un même individu n'expriment pas le même répertoire de récepteurs KIR (Gardiner, C.M. 2008) (**Figure 20**). La diversité des récepteurs KIR est multifactorielle et dépend : i) des diverses combinaisons alléliques de quatorze gènes codant pour ces récepteurs hérités des parents, ii) de l'existence de polymorphismes mineurs au niveau des séquences alléliques de chaque gène KIR et iii) de la diversité des molécules KIR exprimées à la surface des cellules NK circulantes (Uhrberg, M. et al. 1997; Purdy, A.K. and Campbell, K.S. 2009). Les gènes codant pour les récepteurs KIR situés dans le LCR sont disposés en tandem au sein d'haplotypes (groupe de gènes) dont le nombre de gènes et la distribution des allèles activateurs et inhibiteurs varient considérablement (Uhrberg, M. et al. 1997). L'haplotype humain le plus commun est l'haplotype A. Il code pour la plupart des récepteurs KIR inhibiteurs tels que KIR3DL1-3 et KIR2DL1-3 et pour les récepteurs KIR activateurs dont KIR2DS4 et KIR2DL4 (Vilches, C. and Parham, P. 2002) (**Tableau 3**). Le récepteur KIR2DS4 n'est pas fonctionnel chez 80% des américains issus d'une descendance européenne (Hsu, K.C. et al. 2002; Carrington, M. and Martin, M.P. 2006). Alors que l'ARNm de KIR2DL4 est constitutivement présent dans ces cellules, une forte proportion des allèles de KIR2DL4 n'est pas exprimée à la surface des cellules NK (Vilches, C. and Parham, P. 2002; Goodridge, J.P. et al. 2007). Par conséquent, de nombreux haplotypes A ne possèdent pas de récepteur KIR activateur fonctionnel. En revanche, les haplotypes B codent pour au moins deux récepteurs activateurs, KIR2DS4 et KIR2DS ou KIR3DS (**Tableau 3**) (Vilches, C. and Parham, P. 2002; Carrington, M. and Martin, M.P. 2006). La répartition des haplotypes A et B des récepteurs KIR varie énormément entre les différents groupes ethniques. En effet, même si ces deux haplotypes sont répartis uniformément chez les individus de descendance européenne, l'haplotype A est dominant chez les populations coréenne et japonaise alors qu'il est éclipsé par l'haplotype B chez les arborigènes australiens (Hsu, K.C. et al. 2002; Yawata, M. et al. 2002; Whang, D.H. et al. 2005). Outre la diversité des haplotypes des gènes KIR, des polymorphismes mineurs au niveau des gènes KIR et HLA peuvent également influencer leur affinité pour leurs ligands et leurs taux d'expression à la surface des cellules. Par exemple, différents allèles du récepteur KIR3DL1, un des gènes KIR le plus polymorphique, peuvent être exprimés à la surface des cellules dans des proportions variables (Yawata, M. et al. 2006). De plus, certains allèles de KIR codent pour des récepteurs jamais retrouvés à la surface des cellules. La ou les fonctions de ces formes intracellulaires de récepteurs KIR n'a (ont) pas encore été identifiée(s)

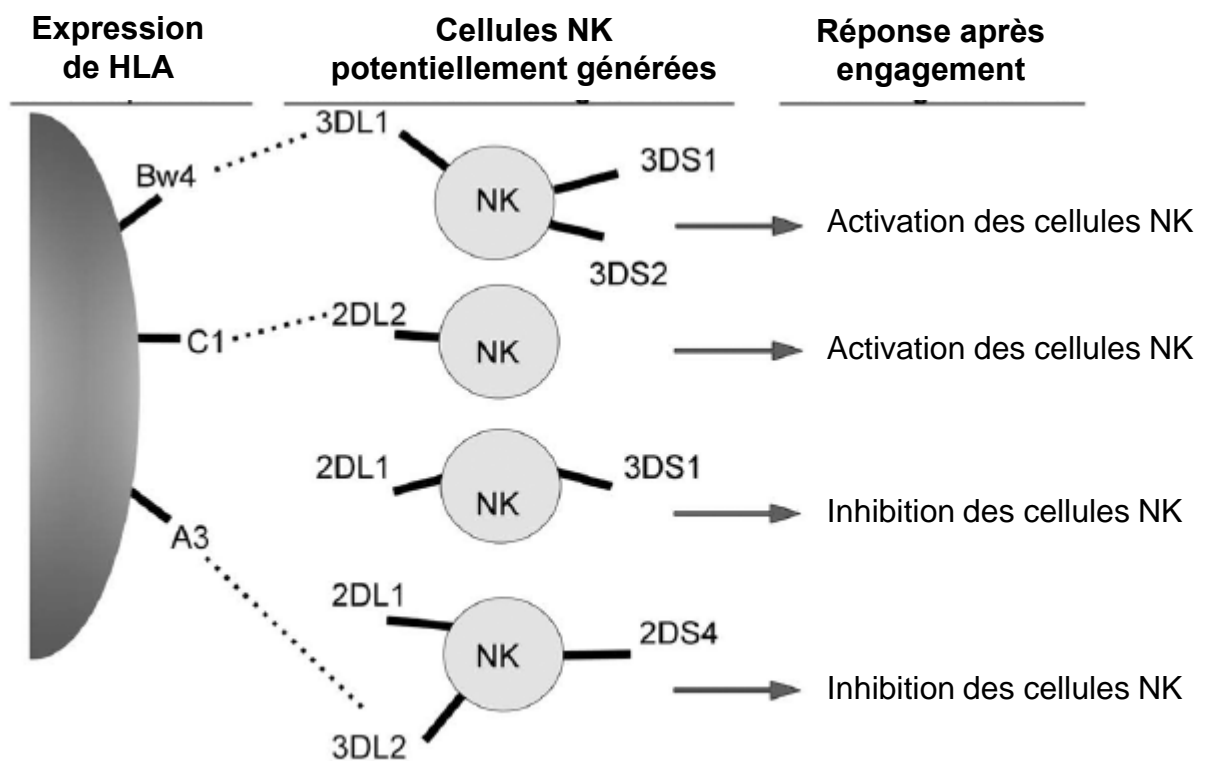


Figure 21 : Impact des polymorphismes alléliques sur le répertoire des KIR à la surface des cellules NK et sur la réponse de ces cellules

(D'après Purdy, A.K. and Campbell, K.S. 2009)

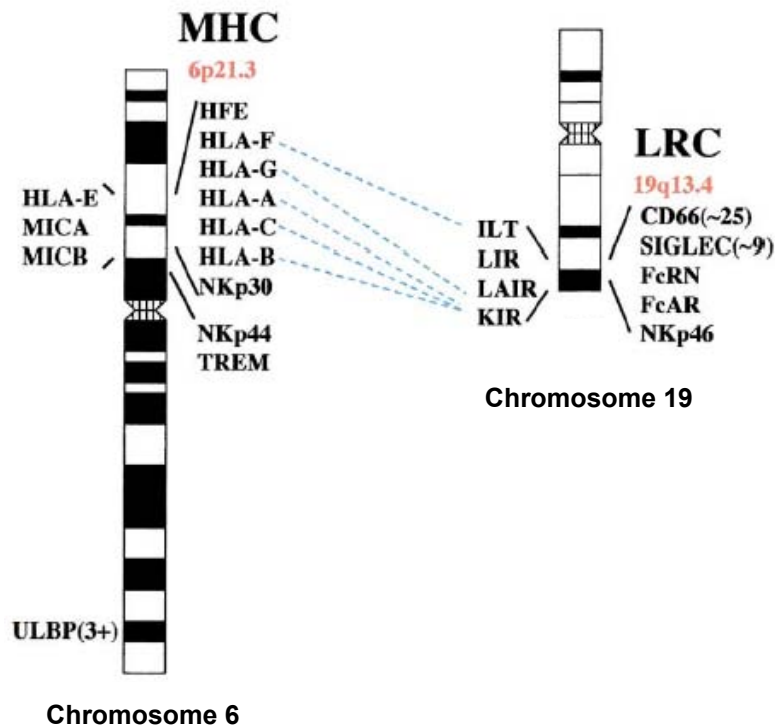


Figure 22 : Localisation chromosomique des gènes codant pour les récepteurs KIR et les HLA

(D'après Trowsdale, J. 2001)

(Pando, M.J. et al. 2003; Martin, M.P. et al. 2007). Des mutations du motif HLA-Bw4 modifient non seulement l'affinité de liaisons mais, aussi le pouvoir d'inhibition du récepteur KIR3DL1 (Khakoo, S.I. et al. 2002; Sanjanwala, B. et al. 2008). De même, des modifications dans la séquence protéique de HLA-C1 et de HLA-C2 altèrent leur affinité pour les récepteurs KIR2DL2/3 et KIR2DL1 respectivement (Moesta, A.K. et al. 2008). Par conséquent, les polymorphismes alléliques influencent l'affinité des récepteurs KIR pour HLA ainsi que l'expression de KIR et de HLA à la surface des cellules. Cette diversité génomique est donc à l'origine du répertoire de cellules NK circulantes qui expriment des combinaisons distinctes de récepteurs KIR (**Figure 21**) (Shilling, H.G. et al. 2002).

Les récepteurs KIR et les molécules HLA sont codés par des gènes situés sur des chromosomes différents et sont ainsi hérités indépendamment (**Figure 22**). Par conséquent, certains récepteurs KIR peuvent être exprimés en l'absence de leurs ligands HLA (Trowsdale, J. 2001). Les récepteurs KIR sont retrouvés sur les cellules NK, les cellules T et les cellules NKT et possèdent ainsi le potentiel de moduler la réponse immune innée et adaptative. Le fort polymorphisme des gènes des récepteurs KIR et de leurs ligands HLA associé à leur expression indépendante, génère donc des combinaisons KIR/HLA pouvant influencer la susceptibilité à diverses pathologies (Ahlenstiel, G. et al. 2008; Korbel, D.S. et al. 2009). En effet, certaines associations KIR/HLA augmentent la susceptibilité ou la résistance aux infections virales (Hépatite C, SIDA), aux maladies inflammatoires chroniques ou auto-immunes (vascularite, psoriasis, diabète, bronchectasie idiopathique) et à plusieurs cancers (mélanome, leucémie, néoplasie cervicale, lymphome de Hodgkin) (Bashirova, A.A. et al. 2006) (**Tableau 4**). Des stratégies thérapeutiques ayant pour but de diminuer les fonctions des récepteurs KIR inhibiteurs ont été envisagées afin de potentialiser l'activité des cellules NK dans le traitement des cancers et des infections virales (Ljunggren, H.G. and Malmberg, K.J. 2007). Une étude, *in vitro*, montre que la combinaison du Rituximab®, un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule de CD20 portée par la plupart des lymphocytes B, à un anticorps qui bloque les récepteurs KIR augmente significativement l'activité cytotoxique des cellules NK primaires comparativement au traitement par le Rituximab® seul (Binyamin, L. et al. 2008). Dans un modèle de souris transgénique pour lequel les cellules NK possèdent pour seul récepteur inhibiteur KIR, le KIR2DL3, le blocage de ce dernier par un anticorps n'altère pas la reconnaissance des cellules du Soi par les cellules NK mais, accroît leur cytotoxicité vis-à-vis des cellules tumorales HLA-C1⁺ (Sola, C. et al. 2009). Dans un autre modèle murin humanisé, l'inhibition des récepteurs inhibiteurs KIR2DL1-3 par un anticorps stimule également l'activité cytotoxique des cellules NK envers des cellules tumorales leucémiques sans toucher les cellules mononuclées circulantes (Romagne, F. et al. 2009). Ces études fournissent des preuves cliniques montrant que le blocage des récepteurs KIR peut être une option thérapeutique envisageable pour stimuler l'activité cytotoxique des cellules NK vis-à-vis des cellules tumorales chez des patients cancéreux.

Tableau 4 : Pathologies associées à l’expression des récepteurs KIR

Pathologie	Expression de KIR	Effet
Autoimmune/inflammation		
Psoriasis	2DS1, 2DL5, haplotype B	Susceptibilité
Vascularite	2DS2	Susceptibilité
Diabète	2DS2/HLA-C1, 2DS2, 2DL2	Susceptibilité
Bronchectasie idiopathique	2DS1 ou 2DS2/HLA-C1	Susceptibilité
Infection		
SIDA	3DS1/HLA-B	Progression faible
Hépatite C	2DL3/HLA-C1, 3DS1/HLA-B	Inhibition de la progression
Cancer		
Mélanome	2DL2, 2DL3, HLA-C1	Susceptibilité
Leucémie	2DL2	Susceptibilité
Néoplasie cervicale	3DS1, Absence de HLA-C2	Susceptibilité
Lymphome de Hogkin	Expression anormale de KIR	Contribue à la pathogénicité de la maladie

(D’après Bashirova, A.A. et al. 2006)

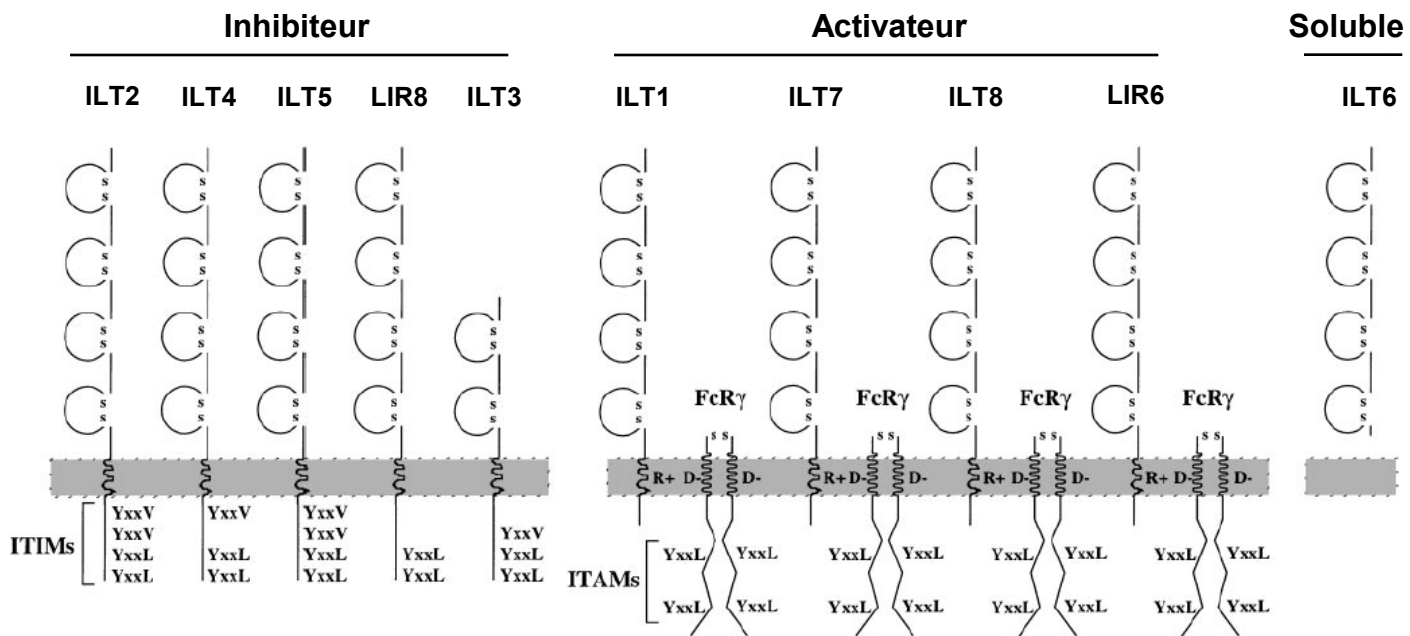


Figure 23 : Structure des récepteurs de la famille ILT/LIR

(D’après Colonna, M. et al. 1999)

- Les molécules de la famille ILT/LIR/CD85

Les gènes codant pour les récepteurs du type « immunoglobulin like transcripts » (ILT) ou « leucocyte Ig like receptors » (LIR) ou CD85 sont localisés sur le chromosome 19 au niveau du LCR (Wende, H. et al. 1999; Martin, A.M. et al. 2002). Ces récepteurs sont génétiquement, structurellement et fonctionnellement proches des récepteurs KIR et sont non seulement exprimés par les cellules NK mais, aussi par les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (Cella, M. et al. 1997; Colonna, M. et al. 1999). Les récepteurs ILT, caractérisés par la présence de deux ou quatre domaines extracellulaires de type « Ig-like », se différencient par leurs domaines transmembranaires et cytoplasmiques (**Figure 23**) (Hayami, K. et al. 1997; Kubagawa, H. et al. 1997). Comme pour les récepteurs KIR, la longueur de leur domaine cytoplasmique définit le type de signal qu'ils relaient. Ainsi, les récepteurs ILT2, ILT3, ILT4, ILT5 et LIR8 possèdent un long domaine cytoplasmique contenant des motifs ITIM permettant le recrutement de la tyrosine phosphatase SHP-1, qui déclenche un signal inhibiteur (Arm, J.P. et al. 1997; Cella, M. et al. 1997; Colonna, M. et al. 1998; Fanger, N.A. et al. 1998). Les récepteurs ILT1, « ILT1-like protein », ILT7, ILT8 et LIR6 ont un domaine cytoplasmique court comprenant un résidu arginine chargé associé à la protéine adaptatrice Fc ϵ RI γ . Cette dernière possède des motifs ITAM, relayant ainsi des signaux activateurs (Borges, L. et al. 1997; Colonna, M. et al. 1999). En ce qui concerne le récepteur ILT6, il ne présente ni domaine cytoplasmique, ni domaine transmembranaire suggérant qu'il pourrait être sécrété (Arm, J.P. et al. 1997; Borges, L. et al. 1997).

Seuls les récepteurs ILT1 et ILT2 sont exprimés par les cellules NK (Colonna, M. et al. 1999). ILT2 est un récepteur inhibiteur doté de quatre domaines extracellulaires « Ig-like » et de quatre motifs ITIM intracellulaires (Colonna, M. et al. 1997). Il interagit avec les molécules HLA-A et HLA-B et possède une faible affinité pour HLA-C (Colonna, M. et al. 1997; Fanger, N.A. et al. 1998). Il peut également se lier à des molécules non classiques du CMH de type I telles que HLA-G et HLA-E, avec une affinité plus importante pour HLA-G (Colonna, M. et al. 1997; Colonna, M. et al. 1999; Navarro, F. et al. 1999). Cette dernière est exprimée par les trophoblastes fœtaux s'implantant dans la déciduale maternelle au cours de la grossesse (Moreau, P. et al. 1999; Ponte, M. et al. 1999). Par conséquent, l'interaction HLA-G/ILT2 pourrait inhiber les leucocytes de la muqueuse utérine, dont les cellules NK, contribuant ainsi à la tolérance materno-fœtale (Colonna, M. et al. 1997; King, A. et al. 1997; Colonna, M. et al. 1999). En effet, la fixation de HLA-G sur le récepteur ILT2 inhibe l'activité cytotoxique des cellules NK mais, également leur production d'IFN- γ (Morel, E. and Bellon, T. 2008; Favier, B. et al. 2010). Contrairement aux autres molécules du CMH de classe I qui fixent et présentent des peptides du Soi, les molécules HLA-E fixent et présentent des peptides dérivés de séquences signal des molécules classiques du CMH de type I à savoir HLA-A, B et C et de la

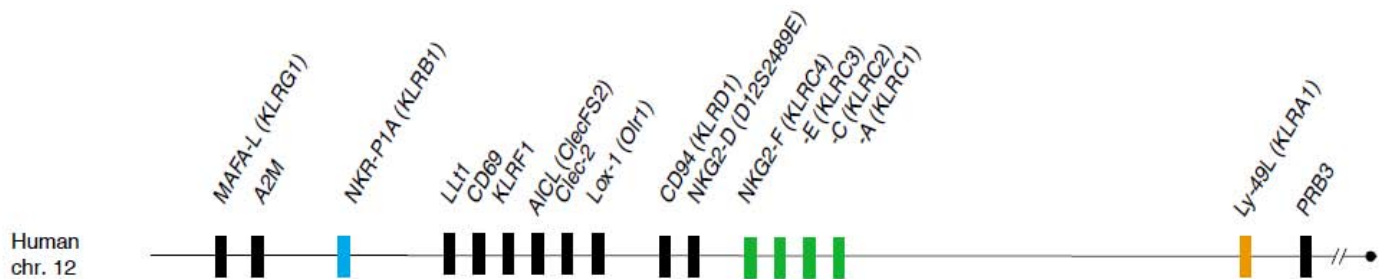


Figure 24 : **Organisation du complexe NK (NKC) dans le chromosome 12**
(D'après Barten, R. et al. 2001)

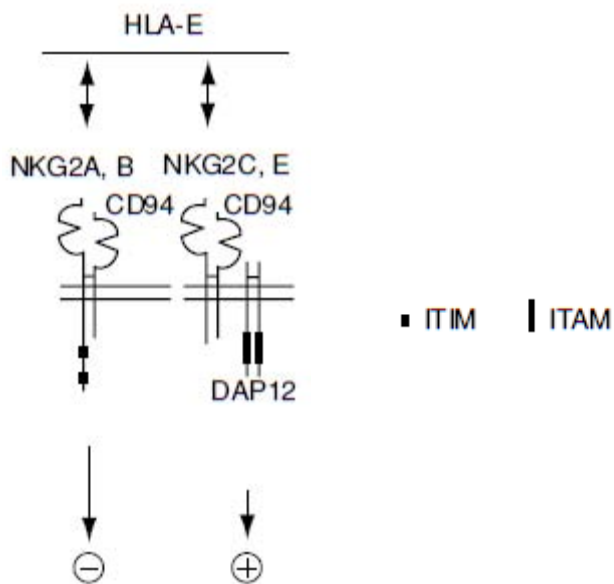


Figure 25 : **Structure des récepteurs CD94/NKG2**

ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activating motif ; ITIM : immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
(D'après Biassoni, R. 2009)

molécule non classique du CMH de classe I telle que l'HLA-G. La fixation de ces séquences signal est indispensable pour la stabilisation et l'expression membranaire de HLA-E. Ainsi, une diminution de l'expression des molécules du CMH de type I, telles que HLA-A, B, C et G, mène à une réduction de l'expression de la molécule HLA-E. L'interaction entre le récepteur ILT2 et HLA-E permet alors aux cellules NK de surveiller indirectement, d'une part, l'expression des autres molécules du CMH de classe I par une cellule donnée et, d'autre part, l'expression de la molécule HLA-E elle-même (Braud, V. et al. 1997; Lee, N. et al. 1998). Outre les molécules du CMH de type I, le récepteur ILT2 est également capable de se lier à la protéine UL18 synthétisée par le cytomégalo virus humain (Cosman, D. et al. 1997). Si l'interaction ILT2/UL18 est bien caractérisée, en revanche, sa fonction n'est pas très clairement définie du fait d'études contradictoires montrant soit une inhibition (Reyburn, H.T. et al. 1997; Kim, J.S. et al. 2004) soit une activation des cellules NK (Leong, C.C. et al. 1998; Prod'homme, V. et al. 2007). Concernant le récepteur ILT1, son ligand reste encore inconnu.

ii. Les récepteurs de la superfamille des lectines C

- Les hétérodimères CD94/NKG2

Les gènes de CD94 et NKG2 sont colocalisés sur le chromosome 12 humain dans le complexe NK (NKC) en position 12p12.3-p13.2 (**Figure 24**) (Barten, R. et al. 2001). Le récepteur CD94 est un gène unique lié à quatre gènes de la famille NKG2 (NKG2A, NKG2C, NKG2E et NKG2F) (Plougastel, B. and Trowsdale, J. 1998; Barten, R. et al. 2001). Contrairement aux gènes des récepteurs KIR, les gènes de récepteurs CD94 et NKG2 présentent peu de polymorphismes, et les rares variations alléliques n'affectent pas la fonction de ces récepteurs (Shum, B.P. et al. 2002). Ces gènes codent pour des protéines de type II de la famille des lectines de type C. Le CD94 est exprimé à la surface des cellules NK sous la forme d'hétérodimère avec NKG2A ou NKG2C ou NKG2E (**Figure 25**) (Lazetic, S. et al. 1996; Brooks, A.G. et al. 1997). Le CD94 étant dépourvu de partie cytoplasmique, la transduction du signal est assurée par NKG2 (Chang, C. et al. 1995). Comme pour les récepteurs KIR, la taille du domaine intracellulaire des NKG2 définit le type de signal qu'ils relaient. Ainsi, les complexes CD94/NKG2A et CD94/NKG2B (le NKG2B étant une forme alternative du NKG2A) ont un domaine cytoplasmique long contenant des motifs ITIM et induisent un signal inhibiteur *via* les protéines phosphatases SHP-1 et SHP-2 (Houchins, J.P. et al. 1997; Le Drian, E. et al. 1998; Masilamani, M. et al. 2006). En revanche, les complexes CD94/NKG2C et CD94/NKG2E possèdent un domaine intracellulaire court avec un résidu lysine chargé permettant le recrutement de la protéine DAP12 qui contient des motifs ITAM capables d'induire un signal activateur grâce aux protéines Syk et/ou ZAP-70 (Lanier, L.L. et al. 1998; Wu, J. et al. 2000). De plus, NKG2F est également pourvu d'un domaine transmembranaire et cytoplasmique mais, ne possède pas de région extracellulaire du fait d'un codon stop qui interrompt la synthèse du domaine « lectin-like » (Plougastel, B. and Trowsdale, J. 1997).

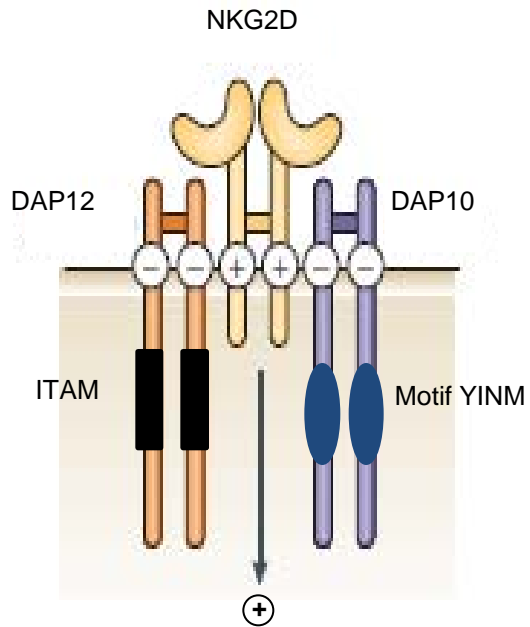


Figure 26 : **Structure des récepteurs NKG2D**

ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activating motif ; MIC A/B : CMH I chain related protein A and B ; ULBP : UL16 binding protein 1 to 5

(D'après Raulet, D.H. 2003)

Les complexes CD94/NKG2A, CD94/NKG2C et CD94/NKG2E reconnaissent HLA-E, une molécule non classique du CMH de classe I (Kaiser, B.K. et al. 2008). Comme pour les récepteurs ILT2, cette liaison permet aux cellules NK de surveiller indirectement l'expression des autres molécules du CMH de classe I par une cellule donnée et l'expression de la molécule HLA-E elle-même (Braud, V. et al. 1997; Lee, N. et al. 1998). Le complexe inhibiteur CD94/NKG2A se lie à HLA-E avec une affinité plus importante que les complexes activateurs CD94/NKG2C et CD94/NKG2E suggérant ainsi une prépondérance de l'inhibition (Kaiser, B.K. et al. 2008). Cependant, des études montrent que le peptide présenté par HLA-E influence l'affinité des récepteurs CD94/NKG2 inhibiteurs et activateurs (Llano, M. et al. 1998; Michaelsson, J. et al. 2002). En effet, le récepteur inhibiteur CD94/NKG2A ne reconnaît pas la molécule HLA-E contenant des peptides de la protéine Heat shock 60 (Hsp60). Par conséquent, les cellules stressées présentant ce peptide par la molécule HLA-E peuvent être lysées par les cellules NK (Michaelsson, J. et al. 2002). Outre HLA-E, le complexe CD94/NKG2C peut également se lier à la protéine UL18 synthétisée par le cytomégalovirus humain (Kaiser, B.K. et al. 2008). Cette liaison induit un signal activateur *via* CD94/NKG2C et joue donc un rôle positif dans la réponse immune des cellules NK contre ce cytomégalovirus humain (Guma, M. et al. 2006). Cependant, nous avons vu précédemment que la reconnaissance de la protéine UL18 par le récepteur inhibiteur ILT2 induit soit une inhibition (Reyburn, H.T. et al. 1997; Kim, J.S. et al. 2004) soit une activation des cellules NK (Leong, C.C. et al. 1998; Prod'homme, V. et al. 2007). Par conséquent, il est difficile de conclure quant à l'action des cellules NK vis-à-vis des cellules infectées par le cytomégalovirus humain.

- Le récepteur NKG2D

Le gène du récepteur activateur NKG2D est également localisé dans le NKC du chromosome 12 humain en position 12p12.3-p13.2 (**Figure 24**) (Plougastel, B. and Trowsdale, J. 1998; Barten, R. et al. 2001). Ce récepteur, aussi appelé CD314 ou « killer cell lectin-like receptor subfamily k membre 1 » (KLRK1) est une glycoprotéine transmembranaire de type II exprimée à la surface des cellules NK (**Figure 26**) (Garrity, D. et al. 2005). Il est également retrouvé chez différents types de cellules lymphoïdes et myéloïdes dont les LT CD8 (Bauer, S. et al. 1999; Roberts, A.I. et al. 2001; Groh, V. et al. 2003). Comme pour les récepteurs NKG2 précédents, NKG2D est codé par un gène unique dont il existe peu de polymorphismes (Shum, B.P. et al. 2002). Cependant, contrairement aux autres membres de sa famille (NKG2A, NKG2C et NKG2E), le récepteur activateur NKG2D s'exprime sous forme d'homodimère et se fixe sur différents ligands protéiques proches des molécules du CMH de classe I (Raulet, D.H. 2003; Champsaur, M. and Lanier, L.L. 2010). Il ne contient dans son domaine intracellulaire aucun motif de signalisation connu (Houchins, J.P. et al. 1991). En effet, la transduction du signal est assurée par un résidu chargé situé dans le domaine transmembranaire permettant le recrutement d'une protéine adaptatrice. Ainsi, que ce soit chez l'homme ou chez la souris, NKG2D

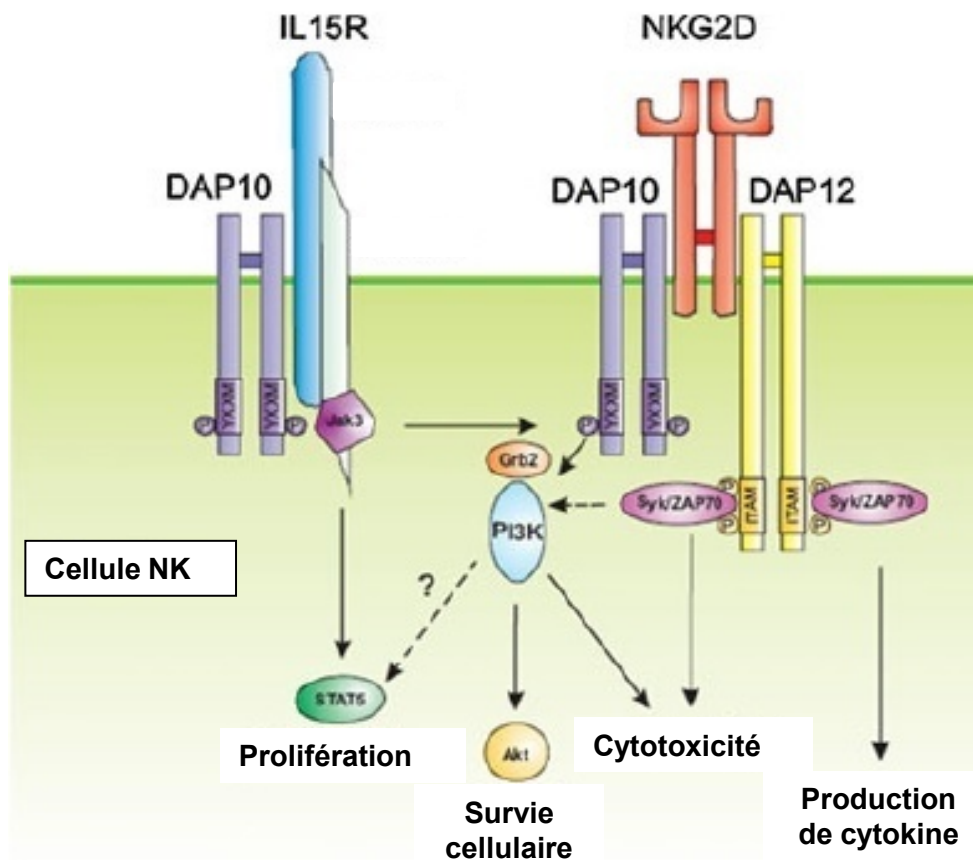


Figure 27 : **Potentialisation du signal de NKG2D par l'IL-15**
(D'après Zafirova, B. et al. 2011)

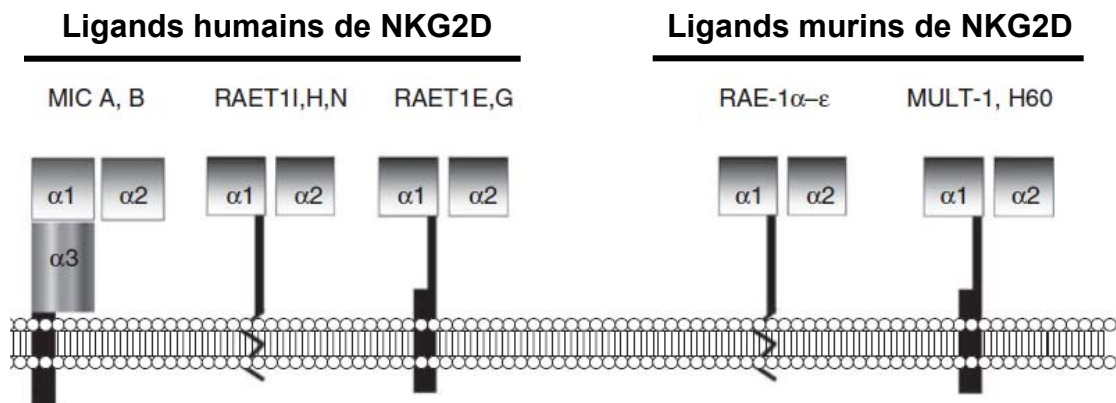


Figure 28 : **Illustration schématique des ligands de NKG2D humain et murin**
H60 : histocompatibility antigen 60 ; MIC A, B : CMH I chain related protein A et B ; MULT-1 : Murin UL16 binding protein like transcript-1; RAE-1 : retinoic acid early inducible-1; RAET : retinoic acid early transcript-1 ou UL16 binding protein (ULBP). RAET1I = ULBP1 ; RAET1H = ULBP2 ; RAET1N = ULBP3 ; RAET1E = ULBP4 ; RAET1G = ULBP5
(D'après Nausch, N. and Cerwenka, A. 2008)

forme un complexe avec deux protéines DAP10 (Garrity, D. et al. 2005). Chez la souris, NKG2D existe sous deux isoformes et peut également s'associer avec deux protéines DAP12 (Rosen, D.B. et al. 2004). La forme longue (NKG2D-L) possède dans son domaine N-terminal intracellulaire 13 acides aminés de plus que la forme courte (NKG2D-S) (Diefenbach, A. et al. 2002) et les deux isoformes sont capables de s'associer à DAP10 ou DAP12 (Rabinovich, B. et al. 2006) (**Figure 26**). La protéine DAP10 contient un motif YINM dans sa partie cytoplasmique. L'engagement du récepteur NKG2D induit la phosphorylation de ce motif et permet ainsi le recrutement de la phospho-inositide 3 kinase (PI3K) et de la protéine « growth factor receptor-bound 2 » (Grb2). Ces deux protéines induisent un signal activateur stimulant la survie et la cytotoxicité des cellules NK (Chang, C. et al. 1999; Wu, J. et al. 2000). Des cellules NK isolées, mises en présence, *in vitro*, de cellules cibles exprimant des ligands de NKG2D, ont une faible cytotoxicité (Bryceson, Y.T. et al. 2006). Cela suggère qu'un signal additionnel est nécessaire pour avoir une activité lytique optimale. En effet, les cellules NK cultivées en présence d'IL-15 ont une activité cytotoxique médiée par NKG2D accrue. La voie de signalisation du récepteur de l'IL-15 s'additionne à celle du récepteur NKG2D (Horng, T. et al. 2007). L'engagement du récepteur de l'IL-15 induit la phosphorylation par la protéine « janus kinase 3 » (JAK3) de DAP10, elle-même couplée au récepteur NKG2D, et facilite ainsi l'induction du signal activateur médié par NKG2D (Horng, T. et al. 2007; Zafirova, B. et al. 2011) (**Figure 27**).

Chez la souris, NKG2D reconnaît des ligands de la famille des protéines « retinoic acid early inducible 1 » (Rae1) (Cerwenka, A. et al. 2000; Diefenbach, A. et al. 2000) dont cinq membres ont été décrits (Rae 1- α , - β , - γ , - δ et - ϵ) (Champsaur, M. and Lanier, L.L. 2010). Dans ce modèle murin, NKG2D fixe également les glycoprotéines du groupe « histocompatibility antigen 60 » (H60) au nombre de trois (H60a, H60b et H60c) (Nausch, N. and Cerwenka, A. 2008) et la protéine murine « UL-16-binding protein like transcript-1 » (MULT-1) (Nausch, N. and Cerwenka, A. 2008). Chez l'homme, NKG2D se lie aux protéines MIC A et MIC B et aux protéines « retinoic acid early transcript » (RAET) 1I, 1H, 1N, 1E et 1G, orthologues des protéines murines Rae1, aussi appelées « UL16 binding proteins 1 à 5 » (ULBP1-5) (Nausch, N. and Cerwenka, A. 2008) (**Figure 28**).

Les ligands du récepteur NKG2D humain ou murin sont pas ou peu exprimés par les cellules saines mais, sont surexprimés par des cellules stressées (protéines MIC) (Groh, V. et al. 1996), dont certaines cellules tumorales (protéines Rae 1, H60, RAET-1 et MIC) (Cosman, D. et al. 2001; Diefenbach, A. et al. 2001; Onda, H. et al. 2001), et les cellules infectées par des virus (Groh, V. et al. 2001) ou des bactéries (protéines MIC) (Tieng, V. et al. 2002). Le récepteur NKG2D jouerait donc un rôle déterminant dans la réponse immunitaire anti-tumorale. En effet, des cellules tumorales transfectées avec des ligands de NKG2D puis injectées à des souris sont éliminées par les cellules NK (Cerwenka, A. et al. 2000; Diefenbach, A. et al. 2000). De plus, chez l'animal, la neutralisation du récepteur NKG2D grâce à un anticorps est suivie du développement de sarcomes (Smyth, M.J. et al. 2005). Les

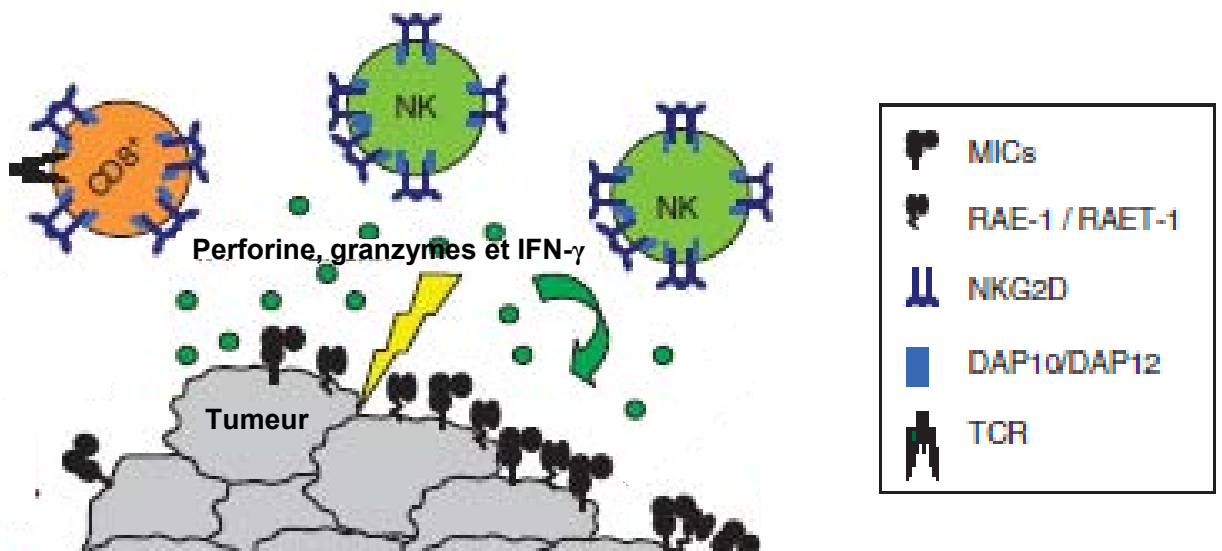


Figure 29 : **Réponse anti-tumorale des cellules immunes via le récepteur NKG2D**

MICs : CMH I chain related proteins ; RAE-1 : retinoic acid early inducible-1; RAET : retinoic acid early transcript-1
(D'après Nausch, N. and Cerwenka, A. 2008)

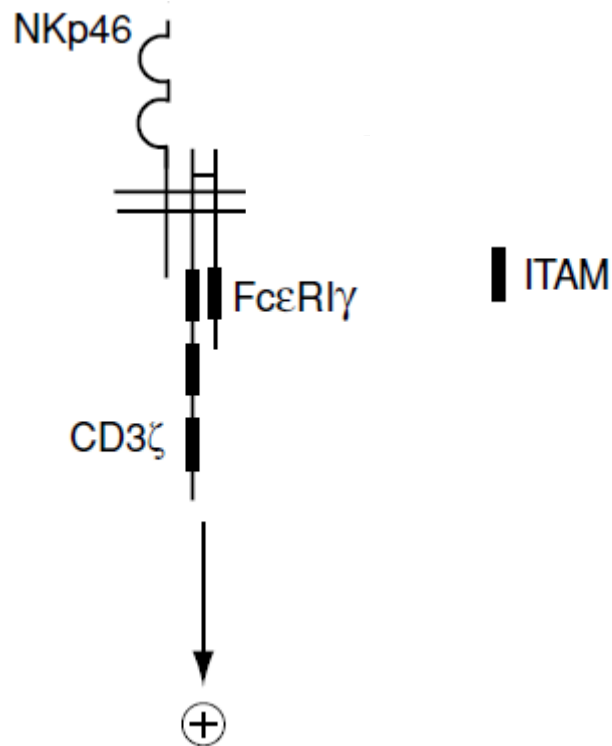


Figure 30 : **Structure du récepteur NKp46**

ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activating motif
(D'après Biassoni, R. 2009)

souris issues du croisement de souris déficientes pour le récepteur NKG2D avec des souris TRAMP, qui développent spontanément des adénocarcinomes au niveau de la prostate, montrent une incidence plus élevée de carcinomes agressifs (Guerra, N. et al. 2008). Ces différentes études confirment le rôle crucial de l'interaction NKG2D/NKG2D ligand dans la surveillance anti-tumorale *in vivo* (**Figure 29**). Néanmoins, des tumeurs exprimant des ligands de NKG2D se développent chez les animaux immunocompétents. Par conséquent, il existe des mécanismes qui inhibent les fonctions effectrices des cellules NK NKG2D dépendantes qui feront l'objet d'une description ultérieure.

iii. Les récepteurs naturels cytotoxiques

Les « natural cytotoxicity receptors » (NCR) sont des récepteurs activateurs de type « Ig-like » majoritairement impliqués dans la reconnaissance et la lyse des cellules néoplasiques ou infectées par des virus. Trois récepteurs ont été décrits : NKp46 (ou CD335), NKp44 (ou CD336) et NKp30 (ou CD337) (Pessino, A. et al. 1998; Cantoni, C. et al. 1999; Pende, D. et al. 1999). Les récepteurs NKp46 et NKp30 sont constitutivement exprimés par les cellules NK alors que le récepteur NKp44 est exprimé uniquement sur les cellules NK activées (Sivori, S. et al. 1997; Cantoni, C. et al. 1999; Pende, D. et al. 1999).

- NKp46

Le récepteur activateur NKp46 est codé par le gène NCR1 localisé dans la région télomérique du LRC sur le chromosome humain 19 en position 19q13.42 (Pessino, A. et al. 1998). Il s'agit d'une glycoprotéine transmembranaire de type I constituée de deux domaines extracellulaires, un domaine transmembranaire contenant un acide aminé chargé, l'arginine, et un domaine cytoplasmique court (Pessino, A. et al. 1998; Ponassi, M. et al. 2003). Le résidu arginine permet le recrutement des protéines adaptatrices FcεRIγ et CD3ζ qui possèdent respectivement un ou trois motifs ITAM (Pessino, A. et al. 1998; Biassoni, R. 2009) (**Figure 30**). L'engagement du récepteur NKp46 induit la phosphorylation de ces motifs par les protéines kinases de la famille Src, telle que p56lck (Salcedo, T.W. et al. 1993; Ting, A.T. et al. 1995). Les protéines kinases de la famille Syk peuvent alors se lier sur les motifs ITAM et déclencher un signal activateur (Stahls, A. et al. 1994; Brumbaugh, K.M. et al. 1997) et ZAP70 (Cone, J.C. et al. 1993). Les structures héparane sulfate protéoglycane ont été suggérées comme étant des ligands de NKp46. Même si ces ligands semblent être indispensables pour la lyse des cellules néoplasiques ou infectées, les conséquences fonctionnelles de ces interactions sont controversées (Bloustain, N. et al. 2004; Hecht, M.L. et al. 2009). En effet, ces structures sont exprimées par des cellules saines et ces dernières ne sont pas lysées par les cellules NK, suggérant que ces ligands ne sont pas spécifiques de NKp46 mais, agissent comme co-récepteurs capables de stimuler l'activité cytotoxique (Arnon, T.I. et al. 2006). Les hémagglutinines virales, hémagglutinine du virus influenza et hémagglutinine neuraminidase du virus de Sendai, retrouvées à la surface des

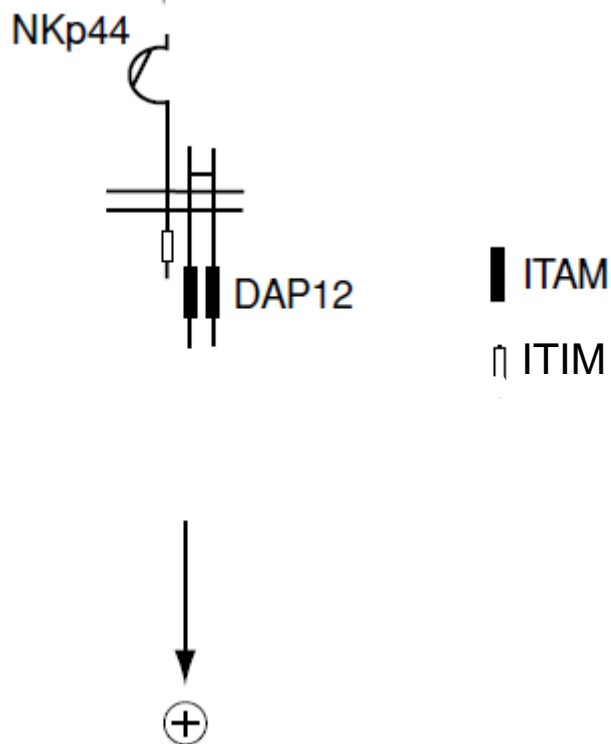


Figure 31 : **Structure du récepteur NKp44**

ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activating motif ; ITIM: immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
(D'après Biassoni, R. 2009)

cellules après une infection virale, ont également été proposées comme ligands (Mandelboim, O. et al. 2001). De plus, la fixation de la vimentine, constituant du cytosquelette, sur le récepteur NKp46 est observée après infection des monocytes par *Mycobacterium tuberculosis* (Garg, A. et al. 2006). Le récepteur NKp46 se lie au domaine « duffy-binding-like- (DBL-) 1 α » de la protéine « *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein -1 » (PfEMP-1) exprimée à la surface des érythrocytes infectés par ce parasite (Mavoungou, E. et al. 2007). Outre son implication dans la lyse de cellules infectées par des virus, des bactéries ou des parasites, le récepteur NKp46 intervient dans l'élimination de cellules tumorales. En effet, même si les ligands du récepteur NKp46 exprimés à la surface des cellules tumorales sont mal connus, des études montrent que ce récepteur joue un rôle primordial dans l'activation des cellules NK après contact avec certaines cellules cancéreuses. En effet, le récepteur NKp46 intervient dans la réponse immune contre certains cancers urothéliaux (Yutkin, V. et al. 2007), des mélanomes (Cagnano, E. et al. 2008), des médulloblastomes (Castriconi, R. et al. 2007) et des myélomes (El-Sherbiny, Y.M. et al. 2007).

- NKp44

Le gène NCR2, situé sur le chromosome 6 humain en position 6p21.1, code pour le récepteur activateur NKp44 (Cantoni, C. et al. 1999). Ce récepteur est caractérisé par un domaine extracellulaire de type V, un domaine transmembranaire contenant un acide aminé chargé (la lysine) et un domaine cytoplasmique court contenant un motif ITIM non fonctionnel (**Figure 31**) (Cantoni, C. et al. 1999; Campbell, K.S. et al. 2004). Toutefois, une étude récente montre que la fixation du « proliferating cell nuclear antibody » (PCNA) sur le récepteur NKp44 inhibe la fonctionnalité des cellules NK *via* le motif ITIM suggérant que ce motif serait capable d'induire un signal inhibiteur (Rosental, B. et al. 2011). En revanche, le résidu lysine du domaine transmembranaire permet le recrutement des protéines DAP12 contenant des motifs ITAM capables de relayer un signal activateur (Cantoni, C. et al. 1999). Le récepteur NKp44 reconnaît les hémagglutinines virales (Arnon, T.I. et al. 2005), les glycoprotéines de l'enveloppe des virus de la Dengue et du West Nile (Hershkovitz, O. et al. 2009) et les bactéries *Mycobacterium tuberculosis*, *Nocardia farcinica* et *Pseudomonas aeruginosa* (Esin, S. et al. 2008). Les structures du type héparane sulfate protéoglycane semblent être impliquées dans la reconnaissance des cellules tumorales par NKp44 (Hershkovitz, O. et al. 2007). Cependant, comme pour NKp46, leur rôle reste controversé (Byrd, A. et al. 2007). De plus, même si les ligands de NKp44 exprimés à la surface des cellules tumorales sont mal connus, des études montrent l'implication de ce récepteur dans la lyse de cellules tumorales par les cellules NK (Vitale, M. et al. 1998; Byrd, A. et al. 2007; Lakshmikanth, T. et al. 2009).

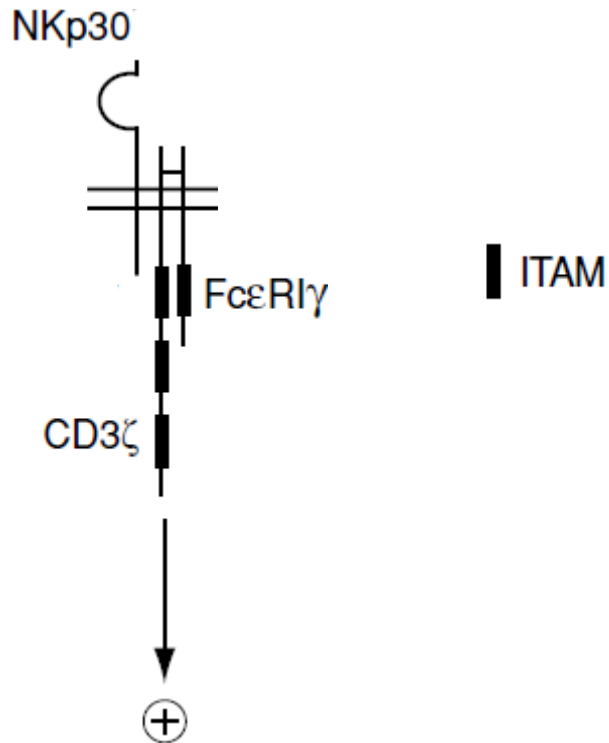


Figure 32 : **Structure du récepteur NKp30**
 ITAM : immunoreceptor tyrosine-based activating motif
 (D'après Biassoni, R. 2009)

Tableau 5 : **Régulation fonctionnelle des cellules NK par les cytokines**

Cytokine	Cytotoxicité	Production de cytokines	Prolifération	Survie
IL-2	+	+	+	+
IL-12	+	+	+	
IL-15	+	+	+	+
IL-18	+	+	+	
IL-21	+	+	+	
TGF- β	-	-	-	

(D'après Hallett, W.H. and Murphy, W.J. 2006)

- NKp30

Le récepteur activateur NKp30 est codé par le gène NCR3 localisé dans le chromosome 6 humain en position 6p21.3 (Pende, D. et al. 1996; Trowsdale, J. 2001). Il est constitué d'un court domaine extracellulaire « Ig-like » de type V, d'un domaine transmembranaire contenant un acide aminé chargé (l'arginine) et d'un domaine cytoplasmique court (Pende, D. et al. 1999). Le résidu arginine permet le recrutement des protéines adaptatrices FcεRIγ et CD3ζ qui possèdent respectivement un ou trois motifs ITAM permettant de relayer un signal activateur (Pende, D. et al. 1999; Moretta, A. et al. 2001) (**Figure 32**). Le récepteur NKp30 est capable de se lier à la protéine pp65 exprimée à la surface du cytomégalo virus humain. Cependant, au lieu d'activer la cytotoxicité, cette interaction inhibe les fonctions effectrices des cellules NK par la dissociation de la chaîne CD3ζ du récepteur NKp30 (Arnon, T.I. et al. 2005). Comme NKp46, NKp30 peut également se fixer sur le domaine DBL-1α de PfEMP-1 exprimé par les érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum* (Mavoungou, E. et al. 2007). Les structures de type héparane sulfate protéoglycane pourraient aussi être impliquées dans la reconnaissance des cellules tumorales par NKp30 (Bloushtain, N. et al. 2004), néanmoins, comme pour les deux NCR précédents, leur fonction reste controversée (Warren, H.S. et al. 2005).

Le récepteur activateur NKp30 joue un rôle important dans la réponse immune anti-tumorale mais, ses ligands présents à la surface des cellules tumorales sont mal connus. En effet, le facteur nucléaire « HLA-B-associated transcript 3 » (BAT3) exprimé par de nombreux myélomes peut se fixer sur NKp30 et induire le relargage de cytokines et le rejet tumoral (Pogge von Strandmann, E. et al. 2007). Plus récemment, il a été montré que NKp30 reconnaît la molécule B7-H6 membre de la famille B7, absente de la surface des cellules saines mais, présente sur diverses cellules cancéreuses primaires ainsi que sur des lignées de cellules tumorales, telles que les cellules K562 et les cellules Hela (Brandt, C.S. et al. 2009). Outre son implication dans le contrôle des pathogènes et des cellules tumorales, NKp30 peut également moduler la réponse immune adaptative (Moretta, A. et al. 2005). En effet, ce récepteur participe à la collaboration entre cellules NK et cellules dendritiques au sein des sites inflammatoires et des tissus lymphoïdes secondaires. Cela fera l'objet d'un paragraphe ultérieur.

vi. Les récepteurs de cytokines

Dans le cadre de la vigilance anti-tumorale, les cytokines constituent un pont entre l'immunité innée et l'immunité adaptative (Belardelli, F. and Ferrantini, M. 2002). Les cellules NK possèdent à leur surface des récepteurs de cytokines qui après leur engagement sont capables de moduler leur activité (**Tableau 5**) (Hallett, W.H. and Murphy, W.J. 2006).

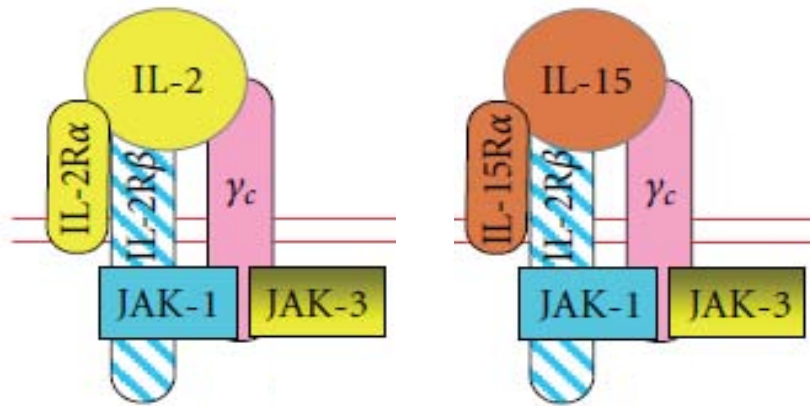


Figure 33 : **Structure du récepteur de l'IL-2 et de l'IL-15**
(D'après Meazza, R. et al. 2011)

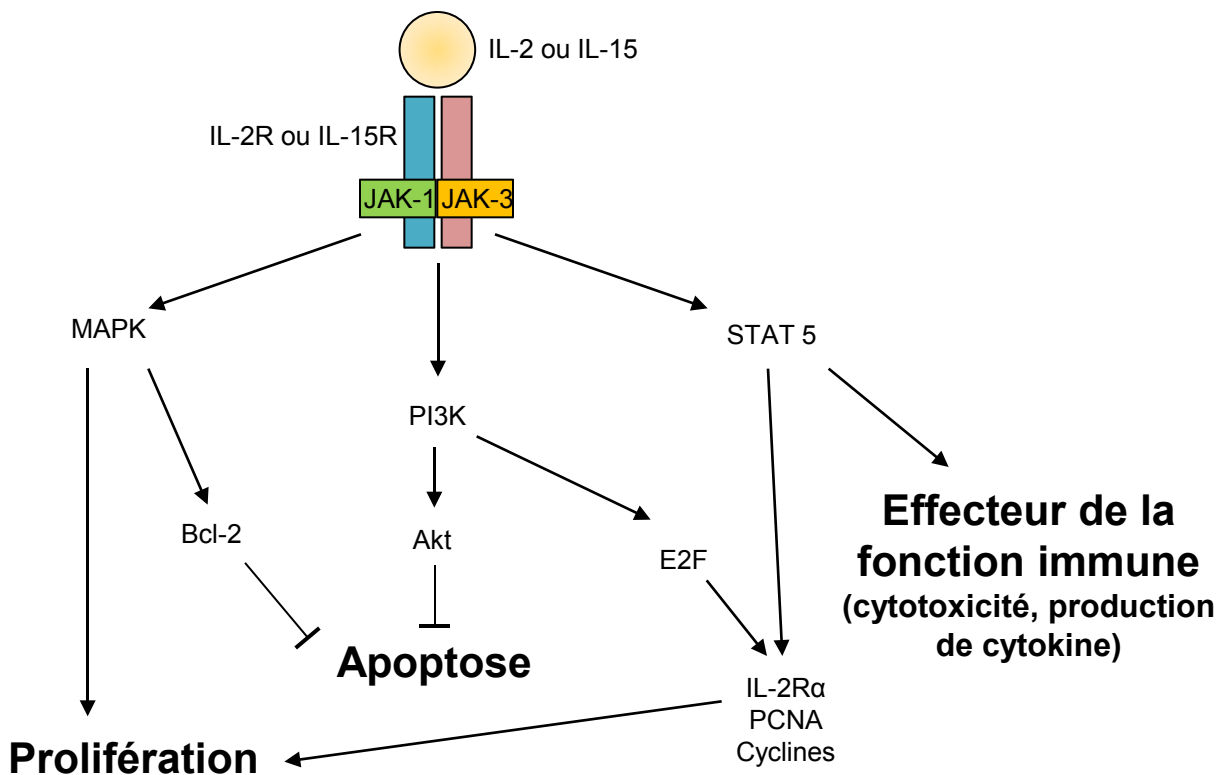


Figure 34 : **Voies de signalisation des récepteurs de l'IL-2 ou de l'IL-15**
(D'après Gaffen, S.L. 2001)

- IL15-R et IL2-R

Les récepteurs de l'IL-15 (IL15-R) et de l'IL-2 (IL2-R) présentent des parties communes, la chaîne γ_c ou CD132, ainsi qu'une chaîne β (IL-2/15R β ou CD122). La spécificité pour chacune des cytokines est conférée par une troisième chaîne l'IL-2R α (CD25) ou l'IL-15R α (Nelson, B.H. and Willerford, D.M. 1998; Kobayashi, H. et al. 2005; Meazza, R. et al. 2011) (**Figure 33**). Contrairement au récepteur de l'IL15 présent spécifiquement sous forme hétérotrimérique (chaîne γ_c , chaîne IL-2/15R β et chaîne α) (Anderson, D.M. et al. 1995), le récepteur de l'IL-2 peut être exprimé sous forme hétérodimérique (chaîne γ_c et chaîne IL-2/15R β) ou sous forme hétérotrimérique. Alors que cette dernière est présente uniquement sur les cellules NK activées, la forme hétérodimérique est constitutivement exprimée (Tsudo, M. et al. 1987). Les domaines cytoplasmiques de la chaîne β et de la chaîne γ_c sont associés respectivement aux protéines « janus tyrosine-kinase-1 et 3 » (JAK-1 et 3) fortement impliquées dans la transduction du signal. La fixation de l'IL-15 ou de l'IL-2 sur son récepteur, induit la phosphorylation des domaines cytoplasmiques du récepteur par les protéines JAK. Cela permet le recrutement des molécules « signal transducer and activator of transcription-5a et 5b » (STAT-5a et 5b). Ces dernières sont phosphorylées par les protéines JAK et forment des homodimères capables de se délocaliser dans le noyau pour activer la transcription de différents gènes (Gaffen, S.L. 2001; Ghoreschi, K. et al. 2009). Parallèlement, la phosphorylation des domaines cytoplasmiques du récepteur peut également stimuler les voies de signalisation MAPK et PI3K (Gaffen, S.L. 2001). Toutes les voies de signalisation (JAK/STAT, MAPK et PI3K) activent de nombreux facteurs de transcription qui déclenchent l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la sécrétion de cytokines et la cytotoxicité (Gaffen, S.L. 2001) (**Figure 34**). En effet, différentes études montrent l'implication de l'IL-15 et l'IL-2 dans la stimulation de la prolifération et de la cytotoxicité des cellules NK (Warren, H.S. et al. 1996; Ferlazzo, G. et al. 2004a). De plus, ces deux cytokines ont un rôle anti-apoptotique, notamment en induisant la sur-expression de la protéine bcl-2 (Armant, M. et al. 1995; Cooper, M.A. et al. 2002). La sécrétion d'IFN- γ , de TNF- α et de GM-CSF par les cellules NK est également induite après fixation d'IL-15 et/ou d'IL-2 sur leur récepteur respectif (Fehniger, T.A. et al. 2003). Des études effectuées chez des souris déficientes en IL-15 ou IL-15R α confirment que cette interleukine et son récepteur jouent un rôle essentiel dans le développement des cellules NK (Lodolce, J.P. et al. 1998; Kennedy, M.K. et al. 2000).

Du fait de leur effet stimulateur, l'IL-2 et l'IL-15 ont été utilisées en immunothérapie cancéreuse. Le traitement de patient atteints de mélanome avec de l'IL-2 recombinante est associé à une involution tumorale (Atkins, M.B. et al. 1999). Cependant, cela est observé uniquement chez certains patients et le traitement se révèle très toxique (Rosenstein, M. et al. 1986) et induit des effets néfastes au niveau cardiaque (Atkins, M.B. et al. 1999). En ce qui concerne l'IL-15, des études pré-cliniques réalisées chez la souris montrent que le traitement par l'IL-15 recombinante entraîne une

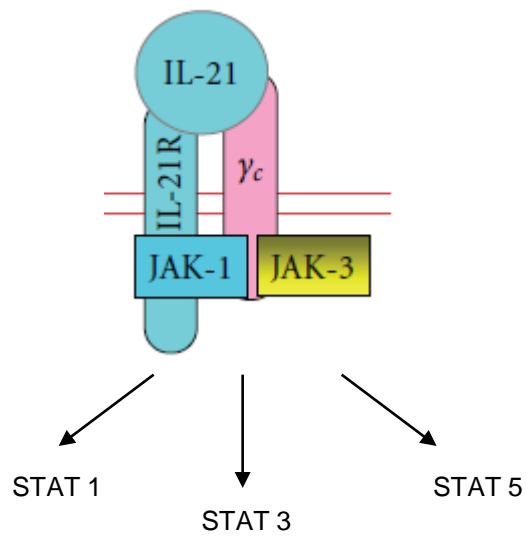


Figure 35 : **Structure du récepteur de l'IL-21**
(D'après Meazza, R. et al. 2011)

activité anti-tumorale avec une toxicité moins importante que l'IL-2 recombinante (Munger, W. et al. 1995). Chez la souris immunodéficiente ou syngénique, des cellules tumorales produisant de l'IL-15 suite à leur transfection avec de l'ADNc d'IL-15, présentent un potentiel tumoral réduit du fait du recrutement des cellules NK (Di Carlo, E. et al. 2000b; Meazza, R. et al. 2000). Une étude de phase I [NCT01021059], dans laquelle des patients porteurs de mélanomes ou de cancers rénaux métastatiques réfractaires reçoivent de l'IL-15 recombinante par voie intraveineuse est actuellement en cours. L'objectif de cette étude est d'évaluer la tolérance à l'IL-15.

- IL21-R

A l'état quiescent, les cellules NK expriment très faiblement le récepteur de l'IL-21 (IL21-R). Cependant, l'expression de ce récepteur est augmentée lorsque les cellules NK sont activées (Parrish-Novak, J. et al. 2000). Il est exprimé sous forme hétérodimérique avec une chaîne γ_c et une chaîne appelée IL-21R, toutes deux possèdent une forte homologie de séquence avec IL-2/15R β (Parrish-Novak, J. et al. 2000; Asao, H. et al. 2001) (**Figure 35**). Les domaines cytoplasmiques de ces deux chaînes sont associés à JAK-1 et JAK-3 qui, après la liaison de l'IL-21 sur son récepteur, induisent la phosphorylation des parties cytoplasmiques du récepteur (Asao, H. et al. 2001). Cela permet principalement le recrutement des protéines STAT-3 mais, aussi de STAT-1 de STAT-5a et de STAT-5b (Asao, H. et al. 2001; Zeng, R. et al. 2007). Les voies de signalisation PI3K et MAPK sont également impliquées dans la transduction du signal de l'IL-21 (Zeng, R. et al. 2007). Elles déclenchent l'expression de gènes impliqués dans la prolifération, la cytotoxicité, le chimiotactisme, l'apoptose et l'expression de l'IL-21 (Zeng, R. et al. 2005; Caprioli, F. et al. 2008; Frederiksen, K.S. et al. 2008). L'IL-21 stimule la différenciation des cellules NK issues des précurseurs de la moelle osseuse (Parrish-Novak, J. et al. 2000), toutefois, des cellules NK de souris déficientes en IL21-R ont une activité et un développement normal (Kasaian, M.T. et al. 2002). Cela est dû au fait que les précurseurs des cellules NK n'expriment pas IL21-R et que l'expression de ce récepteur après activation par l'IL-15 permet uniquement d'accélérer le processus de maturation (Sivori, S. et al. 2003; Perez, S.A. et al. 2006). Le traitement de cellules NK par l'IL-21 associée à des particules virales ou à d'autres cytokines, telles que l'IL-2 ou l'IL-15, stimule l'activité cytotoxique, la production d'IFN- γ et l'expression de perforine (Kasaian, M.T. et al. 2002; Brady, J. et al. 2004). Cependant l'IL-21, combinée à l'IL-2 et l'IL-5, inhibe la prolifération et stimule l'apoptose des cellules NK (Kasaian, M.T. et al. 2002; Brady, J. et al. 2004). De plus, chez la souris, le blocage *via* un anticorps de NKG2D inhibe l'activité cytotoxique des cellules NK activées par l'IL-21 (Takaki, R. et al. 2005). Cette étude montre que l'IL-21 est capable de stimuler la lyse des cellules tumorales par un mécanisme NKG2D dépendent. En revanche, le traitement de cellules NK humaines par de l'IL-21 et de l'IL-2 entraîne une diminution de l'expression de NKG2D et de la cytotoxicité comparativement aux cellules NK stimulées uniquement par de l'IL-2. Cependant, l'IL-21 augmente l'expression de NKp30, suggérant

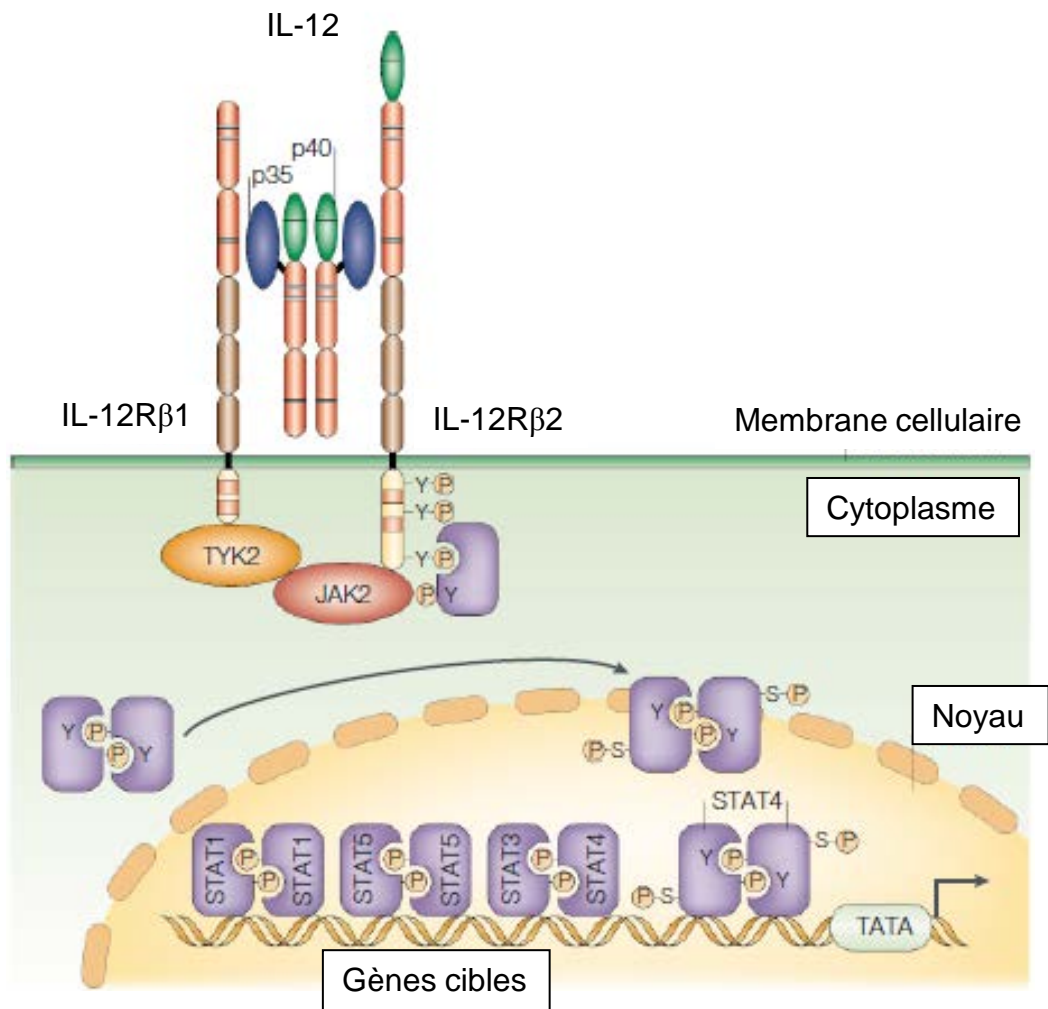


Figure 36 : **Structure du récepteur de l'IL-12 et transduction du signal**
 (D'après Trinchieri, G. 2003)

que l'IL-21 module la reconnaissance des cellules cibles et les fonctions des cellules NK par l'altération du niveau d'expression de différents récepteurs activateurs (Burgess, S.J. et al. 2006).

Eu égard à ses effets stimulateurs sur le système immunitaire, l'IL-21 a également été considérée comme un bon candidat pour l'immunothérapie tumorale. Différents types de cellules tumorales génétiquement modifiées pour produire de l'IL-21 se développent en tumeurs de petite taille lorsqu'elles sont injectées dans des souris syngéniques et sont éventuellement éliminées par la réponse immune médiée par l'IL-21 (Di Carlo, E. et al. 2004). De plus, des cellules néoplasiques pancréatiques transfectées avec le gène de l'IL-21 murin sont lysées par les cellules NK après leur xénogreffe dans des souris immunodéficientes (Ugai, S. et al. 2003). Dans un modèle murin, l'adénocarcinome mammaire sécrète de l'IL-21 qui favorise le recrutement des LT CD8 et des cellules NK et leur production d'INF- γ . Cependant dans ce modèle, l'effet protecteur est partiel du fait de la stimulation par l'IL-21 des lymphocytes Treg capables d'inhiber les cellules immunes (Di Carlo, E. et al. 2004). L'utilisation d'un anticorps ciblant les Treg permet d'annihiler leurs effets néfastes (Comes, A. et al. 2006). Toutes ces études expérimentales ont précédé différentes études cliniques qui utilisent l'IL-21 recombinante associée ou non à d'autres traitements. Ainsi, des essais de phase I chez des patients atteints de mélanome ou de cancer rénal montrent que l'IL-21 a un profil toxique acceptable après son administration en sous-cutané (Schmidt, H. et al. 2010) ou par transfusion répétée (Davis, I.D. et al. 2007; Thompson, J.A. et al. 2008). L'IL-21 stimule l'expression d'INF- γ , de perforine et de granzyme B par les LT CD8 et les cellules NK, suggérant une activation des lymphocytes cytotoxiques (Davis, I.D. et al. 2007; Thompson, J.A. et al. 2008; Schmidt, H. et al. 2010). La réponse positive et la stabilisation de la maladie sont confirmées dans une étude de phase II (Davis, I.D. et al. 2009).

- IL12-R

Le récepteur de l'IL-12 (IL12-R), exprimé par les cellules NK activées, est constitué de deux sous unités β , la sous-unité IL-12R β 1 impliquée dans la fixation du ligand et la sous-unité IL-12R β 2 (Presky, D.H. et al. 1996; Grohmann, U. et al. 1998). Elles sont associées respectivement à la protéine tyrosine kinase 2 (TYK2) et à la JAK2 (Bacon, C.M. et al. 1995a; Zou, J. et al. 1997) (**Figure 36**). Après fixation de l'IL-12 sur son récepteur, les protéines TYK2 et JAK2 phosphorylent le domaine cytoplasmique de la sous-unité IL-12R β 2 permettant ainsi le recrutement de STAT. Bien que les protéines STAT1, STAT3 et STAT4 puissent être activées par l'IL-12, STAT4 apparaît comme étant la protéine majeure dans la signalisation par l'IL-12 (Bacon, C.M. et al. 1995b) (**Figure 36**). Après phosphorylation par TYK2 et JAK2, STAT4 forme un homodimère capable de jouer le rôle de facteur de transcription. La voie de signalisation MAPK est également impliquée dans la transduction du signal de l'IL-12 (Visconti, R. et al. 2000). Ainsi, l'IL-12 stimule la prolifération des cellules NK et la production d'INF- γ (Gately, M.K. et al. 1998; Loza, M.J. and Perussia, B. 2004). L'IL-12 est également capable d'intensifier la cytotoxicité des cellules NK notamment par l'augmentation de

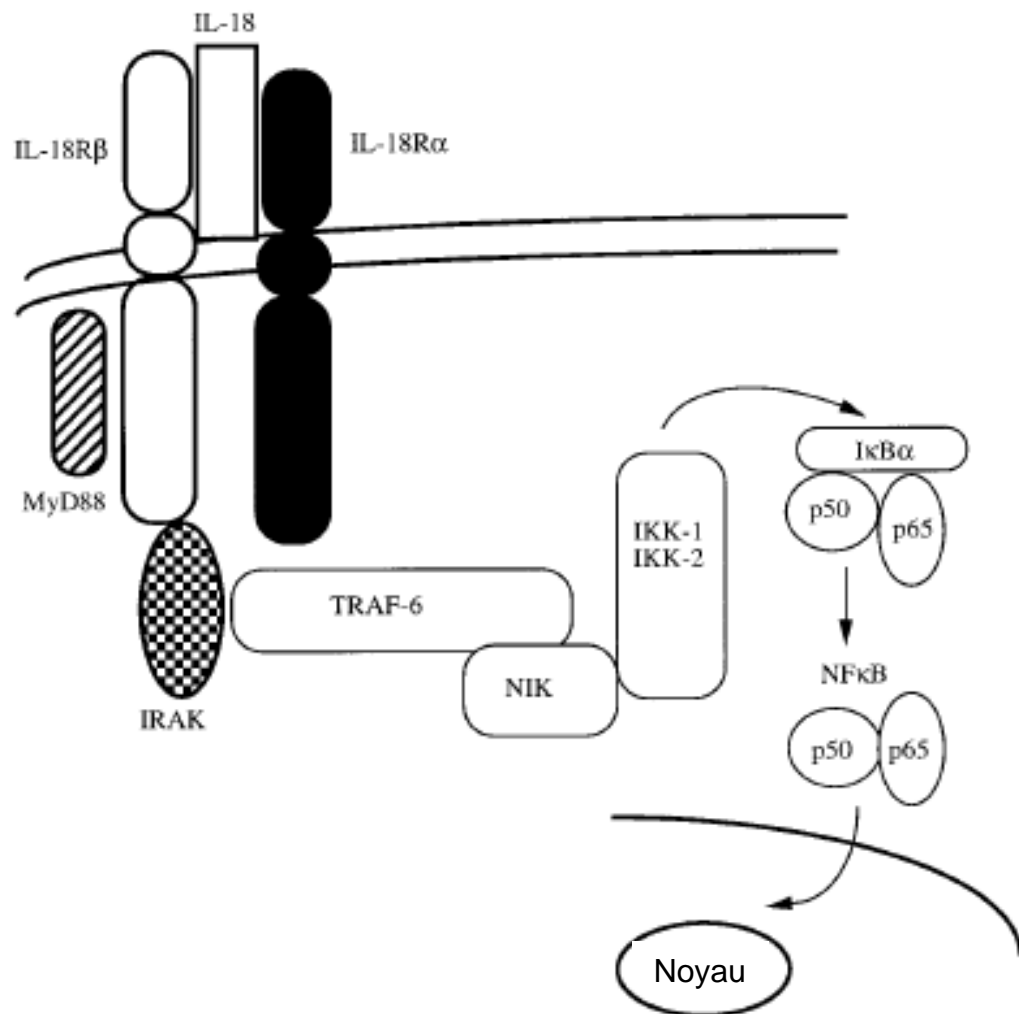


Figure 37 : **Structure du récepteur de l'IL-18 et transduction du signal**
 (D'après Dinarello, C.A. 1999)

l'expression d'effecteurs cytotoxiques tels que le récepteur activateur NKG2D, le récepteur TRAIL et la perforine (Gately, M.K. et al. 1998; Loza, M.J. and Perussia, B. 2004; Zhang, C. et al. 2008).

Les activités anti-tumorale et anti-métastatique de l'IL-12, vis-à-vis des mélanomes, des sarcomes et des carcinomes coliques, mammaires ou rénaux, ont été étudiées dans différents modèles murins (Brunda, M.J. et al. 1993; Colombo, M.P. and Trinchieri, G. 2002). Il en ressort que l'administration d'IL-12 peut retarder, réduire voire dans certains cas complètement inhiber le développement tumoral, avec une efficacité thérapeutique plus importante dans les tumeurs solides (Brunda, M.J. et al. 1993; Colombo, M.P. and Trinchieri, G. 2002). Cependant, les études cliniques démontrent une efficacité thérapeutique moindre en présence de splénomégalies, de leucopénies et des toxicités gastro-intestinales (Ryffel, B. 1997; Car, B.D. et al. 1999). Bien que les raisons d'une efficacité clinique limitée de l'IL-12 soient mal connues, différents mécanismes responsables de l'immunosuppression tels qu'une infiltration de L Treg au niveau tumoral, une augmentation de la production d'IL-10 et une diminution de la production d'IFN- γ semblent être impliqués (Haicheur, N. et al. 2000; Portielje, J.E. et al. 2003).

- IL18-R

Le récepteur de l'IL-18 (IL18-R) exprimé à la surface des cellules NK activées est constitué d'une sous-unité α (IL-18R α) et d'une sous-unité β (IL-18R β) (Torigoe, K. et al. 1997; Kunikata, T. et al. 1998). Ces deux chaînes participent à la transduction du signal. Cependant, la fixation de l'IL-18 sur la sous-unité IL-18R α est nécessaire pour recruter la sous-unité IL-18R β et former un récepteur fonctionnel (Born, T.L. et al. 1998; Debets, R. et al. 2000). La formation de l'hétérodimère (IL-18R α + IL-18R β) déclenche l'activation de la cellule *via* les domaines cytoplasmiques de ces deux sous-unités. Ce complexe recrute différentes molécules adaptatrices intracellulaires dont la « myeloid differentiation factor 88 » (MyD88), l'« IL-1R-associated kinase » (IRAK) et la TRAF6 qui permettent l'activation de différentes voies de signalisation telles que les voies « nuclear factor- κ B » (NF- κ B), « activator protein-1 » (AP-1), JNK et MAPK (Thomassen, E. et al. 1998; Dinarello, C.A. 1999) (**Figure 37**). L'IL-18 est ainsi capable de stimuler la production d'IFN- γ , la prolifération et la cytotoxicité des cellules NK (Son, Y.I. et al. 2001). L'effet de l'IL-18 sur l'activité cytotoxique est dû à une augmentation de l'expression de la perforine (Hashimoto, W. et al. 1999) et de Fas-L qui provoquent l'apoptose des cellules cibles (Hashimoto, W. et al. 1999). L'expression de la sous-unité IL-18R β est modulée par différentes cytokines (Sareneva, T. et al. 2000; Smeltz, R.B. et al. 2001). Par conséquent, l'utilisation d'IL-12, d'IL-23, d'IL-21, d'IL-2 ou d'IL-15 conjointement avec de l'IL-18, afin d'induire la production d'IFN- γ , pourrait passer par un renforcement de l'expression de IL-18R β (Strengell, M. et al. 2002; Hoeve, M.A. et al. 2003; Strengell, M. et al. 2003). De plus, l'IL-18 en synergie avec l'IL-12 provoque également une sur-expression de IL-18R α et une production accrue

d'IFN- γ par les cellules NK (Arend, W.P. et al. 2008). En combinaison avec l'IL-2, l'IL-18 induit également la production d'IL-13 par les cellules NK (Hoshino, T. et al. 1999).

Différentes études démontrent que l'IL-18 joue un rôle ambivalent dans le développement tumoral, d'une part elle engage la réponse immune anti-tumorale et d'autre part elle favorise la progression tumorale et métastatique. En effet, l'administration combinée d'IL-18 et de B7-1, une molécule de co-stimulation, provoque chez la souris, la régression de mélanome avec une gain du nombre de cellules NK infiltrées au niveau de la tumeur. De plus, la persistance de l'effet anti-tumoral après déplétion des cellules T suggère que l'effet cytotoxique est dû aux cellules NK (Cho, D. et al. 2000a). L'IL-18, sécrétée par différentes cellules cancéreuses (Park, H. et al. 2001; Ye, Z.B. et al. 2007), peut également participer à la progression tumorale de par son action pro-angiogénique (Zhang, B. et al. 2004; Kim, K.E. et al. 2007). Par ailleurs, l'IL-18 stimule l'expression de Fas-L sur les cellules tumorales qui provoque l'apoptose des cellules immunitaires présentant Fas à leur surface (Cho, D. et al. 2000b).

- TGF β -R

Le récepteur de TGF- β (TGF β -R) est constitué d'une sous-unité TGF- β I et d'une sous-unité TGF- β II. Après fixation de TGF- β sur TGF- β II, la sous-unité TGF- β I est recrutée puis phosphorylée afin de permettre la fixation des médiateurs intracellulaires SMAD2 et SMAD3. Ces derniers sont alors phosphorylés et se lient à SMAD4 pour former un hétérotrimère capable de se transloquer dans le noyau et d'induire la transcription génique. La cytokine TGF- β active également d'autres voies de signalisation telles que celle de PI3K, de MAPK et de GTPase (Moustakas, A. et al. 2001; Shi, Y. and Massague, J. 2003; Li, M.O. et al. 2006; Yang, L. et al. 2010). Le TGF- β est ainsi capable d'inhiber la production d'IFN- γ , la prolifération et la cytotoxicité des cellules NK (Ghiringhelli, F. et al. 2005a; Meadows, S.K. et al. 2006). La voie de signalisation du TGF- β dans les cellules NK a été mise en évidence dans un modèle de souris transgénique dans lequel la signalisation du TGF- β est bloquée au niveau des cellules NK et des cellules dendritiques (Laouar, Y. et al. 2005). Ainsi, le TGF- β contrôle la production d'IFN- γ par les cellules NK puisque son blocage provoque l'accumulation de cellules NK productrices d'IFN- γ (Laouar, Y. et al. 2005). Le déclin de l'activité cytotoxique des cellules NK en présence de TGF- β serait dû à une moindre expression des effecteurs cytotoxiques tels que le récepteur NKG2D, le récepteur NKp30, la perforine et les granzymes A et B (Castriconi, R. et al. 2003; Lee, J.C. et al. 2004). De plus, la neutralisation de TGF- β prévient non seulement la sous-expression de NKG2D mais, aussi restore l'activité anti-tumorale des cellules NK (Kopp, H.G. et al. 2009).

Durant son développement, la tumeur produit du TGF- β ou induit la production de cette cytokine par les cellules du micro-environnement afin de stimuler sa prolifération tout en inhibant le

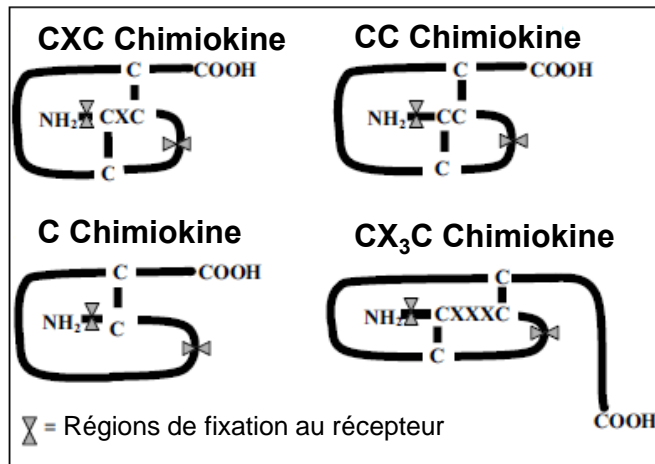


Figure 38 : Représentation schématique des 4 familles de chimiokines
(D'après Townson, D.H. and Liptak, A.R. 2003)

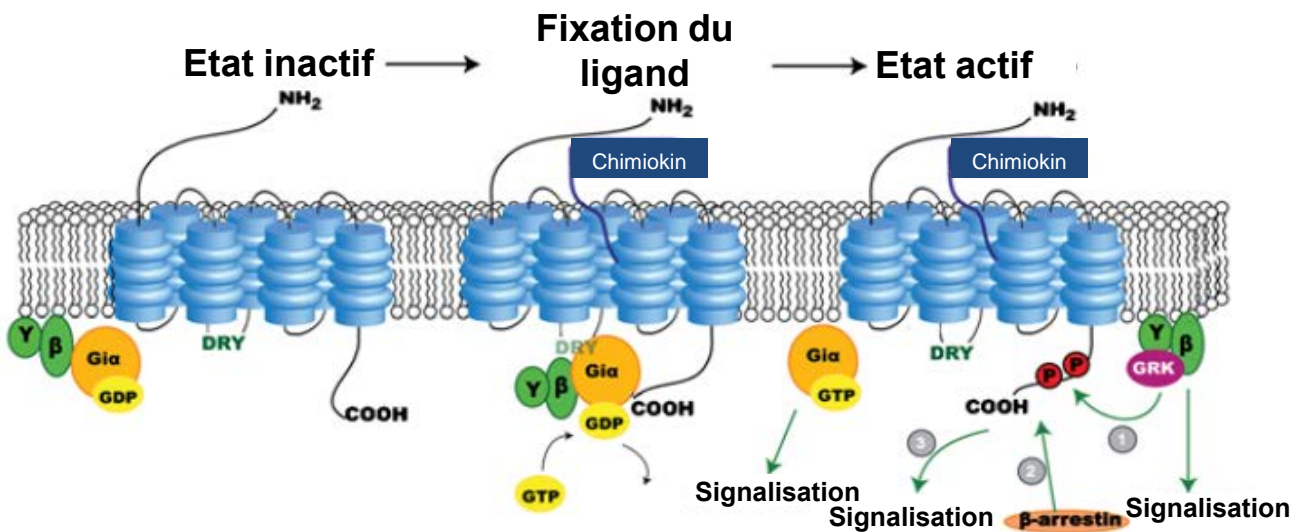


Figure 39 : Structure des récepteurs de chimiokines et transduction du signal
(D'après O'Hayre, M. et al. 2008)

système immunitaire (Chang, H.L. et al. 1993; Stander, M. et al. 1998). En effet, le blocage de la voie de signalisation du TGF- β restaure l'expression des récepteurs NKG2D et NKp30 à la surface des cellules NK de patientes victimes de cancers ovariens (Wilson, E.B. et al. 2011). Chez des patients atteints de gliomes, le TGF- β provoque une diminution de l'expression de NKG2D à la surface des cellules NK et réprime l'expression de MIC A, le ligand de NKG2D, à la surface des cellules cancéreuses. Cette sous-expression de NKG2D est réprimée après inhibition par ARNi de la production de TGF- β par les cellules cancéreuses (Friese, M.A. et al. 2004).

v. Les récepteurs de chimiokines

Les chimiokines ont pour rôle de recruter, aux niveaux circulatoire et tissulaire, les cellules immunitaires impliquées à la réaction inflammatoire. Pour cela, elles interagissent avec des récepteurs à la surface des cellules cibles, entraînant ainsi leur migration vers le site inflammatoire *via* un gradient de concentration chimiokinique (Fernandez, E.J. and Lolis, E. 2002). Alors que certaines chimiokines sont constitutivement sécrétées afin de réguler l'homéostasie du système immunitaire, d'autres sont produites uniquement lors d'infections ou de situations pro-inflammatoires, permettant ainsi le recrutement des leucocytes circulants. Outre leur propriété chimiotactique, elles interviennent dans la migration trans-endothéliale, la prolifération, la différenciation, la maturation et la dégranulation de leurs cibles (Fernandez, E.J. and Lolis, E. 2002). En fonction du nombre de résidus cystéines présents dans la région amino-terminale et du nombre d'acides aminés non conservés (X) qui s'intercalent entre les cystéines, les chimiokines sont réparties en quatre groupes : les CXC, les CC, les XC et les CX₃C (Fernandez, E.J. and Lolis, E. 2002; Townson, D.H. and Liptak, A.R. 2003) (**Figure 38**). Par analogie à la nomenclature des chimiokines, leurs récepteurs sont classés en CXCR, CCR, XCR et CX₃CR. Ils sont constitués d'une région C-terminal et de sept domaines transmembranaires couplés à des protéines G, responsables de la transduction du signal suite à la fixation du ligand (**Figure 39**) (O'Hayre, M. et al. 2008). Un même récepteur peut être activé par plusieurs chimiokines et une chimiokine a la capacité de se fixer sur plusieurs récepteurs. Néanmoins, cette activité pléiotrope est restreinte au sein de chaque groupe de chimiokines (Fernandez, E.J. and Lolis, E. 2002; Townson, D.H. and Liptak, A.R. 2003).

Les cellules NK non activées sont capables de migrer en réponse à deux types de chimiokines, les CXC et les CC. En effet, les cellules NK non activées migrent en réponse aux chimiokines CXCL10 et CXCL11 qui se fixent sur CXCR3, aux CX₃CL1 qui se couplent à CX₃CR (Campbell, J.J. et al. 2001; Inngjerdigen, M. et al. 2001), aux CXCL12 qui se lient à CXCR4 (Inngjerdigen, M. et al. 2001) et aux XCL1 qui s'assemblent à XCR1 (Giancarlo, B. et al. 1996). Les chimiokines CC jouent également un rôle dans la migration des cellules NK non activées en se liant aux CCR1 (CCL3, CCL5, CCL7), CCR2 (CCL2, CCL7, CCL8), CCR3 (CCL5, CCL7, CCL8) et CCR5 (CCL3, CCL4, CCL5, CCL8) (Allavena, P. et al. 1994; Taub, D.D. et al. 1995). L'activation des cellules NK par l'IL-

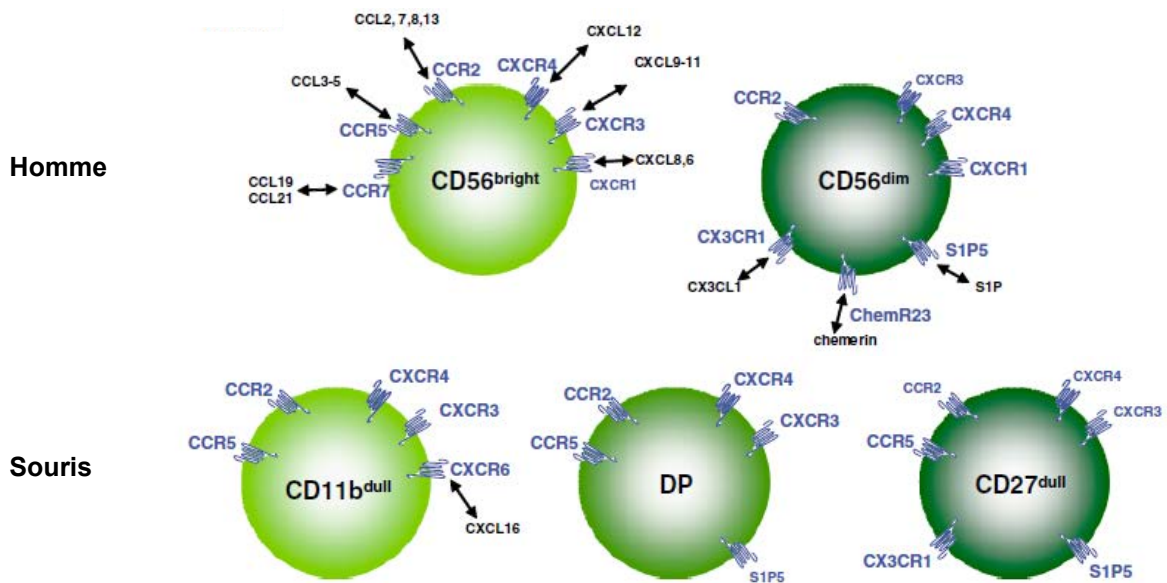


Figure 40 : **Expression des récepteurs de chimiokines par les cellules NK humaines et murines**
 DP : double positive CD11b^{High} CD27^{High}
 (D'après Grégoire, C. et al. 2008)

2 induit l'expression de CCR4 et de CCR8 à leur surface et par conséquent leur migration en réponse à CCL17, CCL22 et CCL1 (Inngjerdingen, M. et al. 2000; 2001).

Les différentes sous-populations de cellules NK humaines et murines n'expriment pas toutes les mêmes récepteurs de chimiokines (**Figure 40**) (Gregoire, C. et al. 2007). Ainsi, les cellules NK CD56^{bright} migrent spécifiquement en réponse aux chimiokines se fixant sur CCR7 (CCL19 et CCL21) et CCR5 (CCL4 et CCL5), alors que les cellules NK CD56^{dim} migrent suite à l'activation des récepteurs CX₃CR1 (CX₃CL1) et/ou chemR23 (chémérine) (Campbell, J.J. et al. 2001; Parolini, S. et al. 2007). Certains récepteurs sont exprimés à la surface de ces deux sous-populations mais, à des niveaux variables. De ce fait, contrairement aux cellules NK CD56^{bright}, les cellules NK CD56^{dim} exprimant faiblement CXCR3 et fortement CXCR1 sont peu ou pas réactives aux CXCL10 et CXCL11 et migrent fortement en réponse aux chimiokines fixant CXCR1 (Campbell, J.J. et al. 2001).

Outre leur effet sur la migration, les chimiokines peuvent également réguler l'activité cytotoxique des cellules NK. En effet, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL10 et CX₃CL1 sont capables de stimuler la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis des cellules cibles K562 (Taub, D.D. et al. 1995; Taub, D.D. et al. 1996). Toutefois, cet effet dépend des sujets sains dont sont issues les cellules NK et est moindre comparé à l'élévation de cytotoxicité en réponse à l'IL-2 (Taub, D.D. et al. 1995; Taub, D.D. et al. 1996). Le mode d'action des chimiokines pour accroître la cytotoxicité des cellules NK est mal connu. Cependant, elles induisent la dégranulation des cellules NK (Taub, D.D. et al. 1995; Taub, D.D. et al. 1996). De plus, CCL2, CCL3, CCL4 et CCL5 provoquent une redistribution à la surface des cellules NK des molécules d'adhérence ICAM-1 et ICAM-3 qui sont nécessaires à la formation des conjugués cellules NK/cellules cibles (Nieto, M. et al. 1998).

vi. Les autres récepteurs

Outre les grandes familles de récepteurs précédemment décrites, les cellules NK expriment d'autres récepteurs tels que le CD16 mais, également des molécules d'adhérence dont certaines sont utilisées comme marqueurs des cellules NK. Dans ce paragraphe, nous ne décrirons que les molécules étudiées dans nos travaux.

- Le CD16

Le CD16, aussi appelé FcγRIII, est un récepteur de faible affinité pour le fragment Fc des IgG. Il est impliqué dans la cytotoxicité dépendante des anticorps « antibody-dependent cellular cytotoxicity » (ADCC). Le CD16 est associé à des homodimères et/ou des hétérodimères de FcεRI-γ et de CD3ζ qui contiennent des motifs ITAM et permettent de relayer un signal activateur après engagement du récepteur avec des IgG. Les cellules NK CD56^{dim} expriment fortement le CD16 alors que les cellules NK CD56^{bright} l'expriment faiblement ou pas du tout (Lanier, L.L. et al. 1986; Lanier, L.L. et al. 1991).

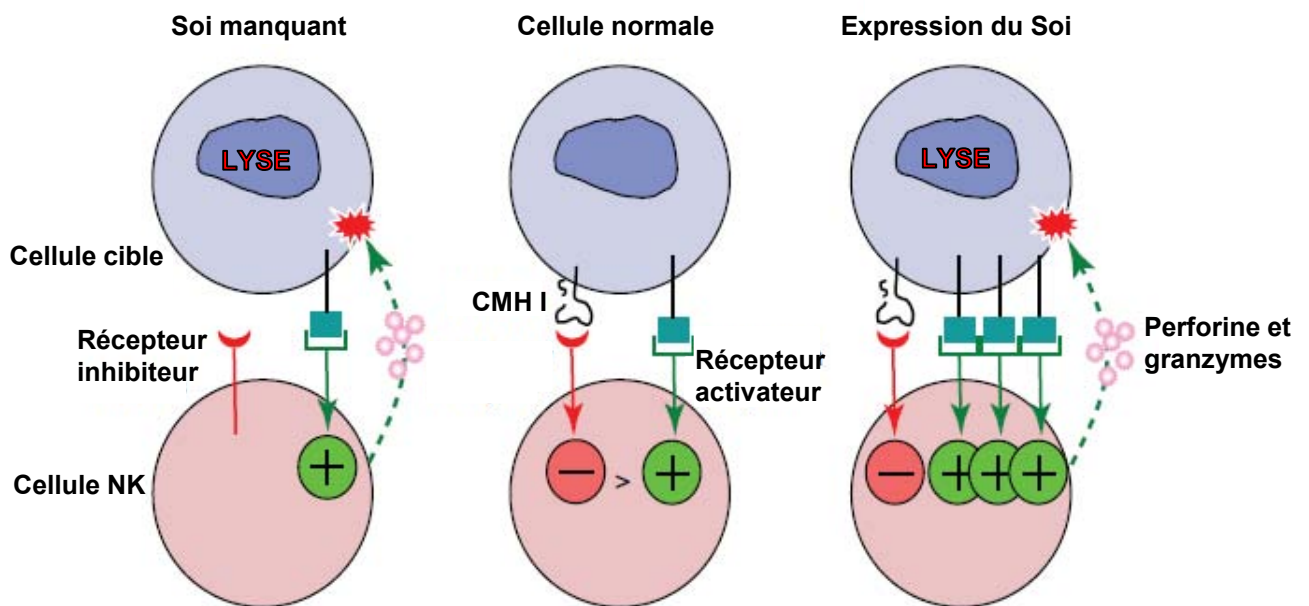


Figure 41 : **Régulation de la cytotoxicité des cellules NK**
 (D'après Elliott, J.M. and Yokoyama, W.M. 2011)

- Le CD56

L'expression du CD56 a été détectée à la surface des cellules NK et de certains lymphocytes T. Par conséquent, la présence du CD56 et l'absence du CD3 caractérisent les cellules NK humaines. Le CD56 est une isoforme de la glycoprotéine membranaire « neuronal cell adhesion molecule » (NCAM) dont le rôle est inconnu (Lanier, L.L. et al. 1986; Lanier, L.L. et al. 1989). Cependant, il semblerait qu'elle intervienne dans l'adhérence des cellules NK aux cellules cibles (Suzuki, N. et al. 1991). Deux sous-populations de cellules NK ont été identifiées en fonction de l'expression membranaire du CD56 : les cellules NK CD56^{bright} et les cellules CD56^{dim} (Cooper, M.A. et al. 2001a; Cooper, M.A. et al. 2001b). La description de ces deux sous-populations a été effectuée dans le chapitre traitant du développement des cellules NK.

- Le CD49b

Le CD49b est une intégrine présente à la surface de cellules NK murines dont le ligand et le rôle ne sont pas connus. Le CD49b associé à l'absence de CD3 est utilisé pour caractériser les cellules NK murines (Arase, H. et al. 2001).

I-2-4-c Education des cellules NK : activation et tolérance du Soi (self tolérance)

La stimulation des cellules NK par la cellule cible est dépendante de l'intégration des signaux reçus *via* ses récepteurs activateurs et inhibiteurs. En général, si les deux types de récepteurs sont engagés, le signal inhibiteur prédomine et la cellule NK ne lyse pas la cellule cible et ne produit pas de cytokines. Si la cellule cible sous-exprime les molécules du CMH de classe I et qu'un récepteur activateur est engagé, la cellule NK considère la cellule cible comme du non Soi et va provoquer sa lyse. A l'inverse, lorsque la cellule cible exprime des molécules du Soi, c'est-à-dire sur-exprime des ligands des récepteurs activateurs, comme dans certains dommages génotoxiques ou certaines infections virales, le signal inhibiteur est dépassé par les signaux activateurs déclenchant l'activation de la cellule NK (Yu, J. et al. 2007; Elliott, J.M. and Yokoyama, W.M. 2011) (**Figure 41**). Cependant, cette théorie du Soi manquant encore dénommé « missing-self » n'explique pas à elle seule la tolérance du Soi par les cellules NK. En effet, certaines cellules NK n'expriment pas de récepteur inhibiteur spécifique du CMH de classe I de l'hôte mais, elles ne lysent pas pour autant les cellules du Soi (Fernandez, N.C. et al. 2005). Durant leur développement, les cellules NK produisent des granules lytiques et de l'IFN- γ qui leurs confèrent donc des fonctions effectrices alors qu'elles n'expriment pas encore les récepteurs inhibiteurs KIR (Kumar, V. and McEnerney, M.E. 2005). En revanche, elles possèdent différents récepteurs activateurs potentiellement spécifiques des molécules du Soi (Moretta, A. et al. 1995; Lanier, L.L. 2005; Stewart, C.A. et al. 2005). Par conséquent, des mécanismes sont nécessaires pour prévenir une activation anormale des cellules NK vis-à-vis des tissus sains. Bien que

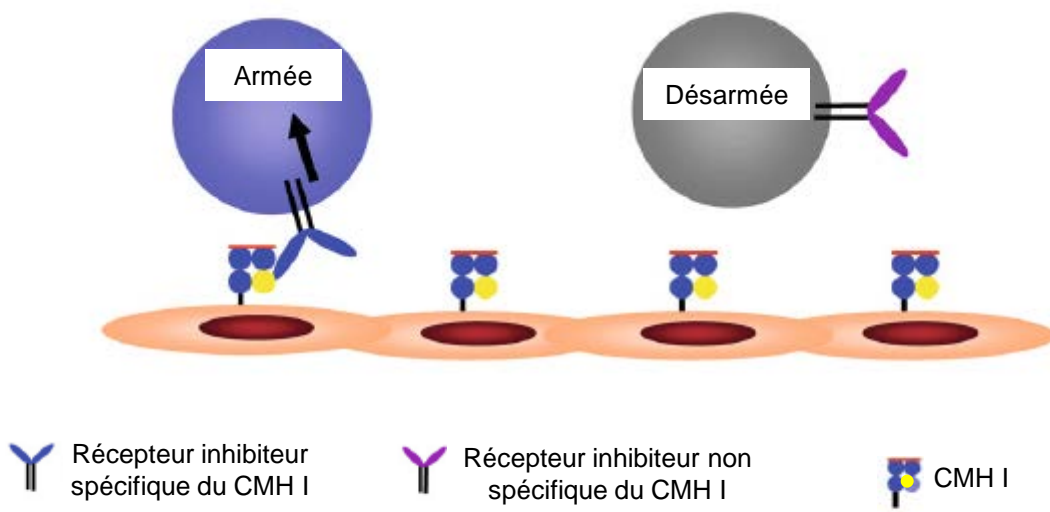


Figure 42 : **Education des cellules NK: hypothèse « arming »**
 (D'après Jonsson, A.H. and Yokoyama, W.M. 2009)

les fonctions et les spécificités de chaque récepteur activateur et inhibiteur soient bien connues, leurs rôles combinés dans l'établissement des capacités fonctionnelles et la tolérance du Soi par les cellules NK restent encore à déterminer. Un consensus général appelé « licensing » stipule que l'éducation des cellules NK est dépendante du CMH (Raulet, D.H. and Vance, R.E. 2006; Vivier, E. et al. 2011). Néanmoins, la manière dont cette éducation est réalisée ainsi que la contribution des récepteurs inhibiteurs par rapport aux récepteurs activateurs à la tolérance du Soi restent encore à préciser. Après avoir défini la théorie du « licensing », nous nous intéresserons aux trois mécanismes proposés pour expliquer le « licensing » des cellules NK : l'hypothèse « arming » ou « stimulatory receptor », l'hypothèse « disarming » ou « inhibitory receptor » et l'hypothèse rhéostat.

i. La définition du « licensing »

L'hypothèse de l'éducation des NK connue sous le terme de « licensing » propose qu'une cellule NK doit dans un premier temps s'engager avec le CMH de classe I du Soi afin d'être réactive aux stimuli ultérieurs qu'elle recevra *via* ses récepteurs activateurs. Ces cellules sont alors dans un état appelé « licensed ». A l'inverse, les cellules NK n'ayant pas eu de contact préalable avec le CMH de classe I sont qualifiées de « unlicensed » (Yokoyama, W.M. and Kim, S. 2006).

Environ 10% des cellules NK CD56^{dim} n'expriment pas le récepteur NKG2A et les récepteurs KIR spécifiques du CMH de classe I du Soi. Ces cellules NKG2A⁻ KIR⁻ ont un taux normal de perforine et de granzymes et répondent fortement à une stimulation par le cocktail PMA et ionomycine. Elles possèdent donc toute la machinerie nécessaire pour exécuter leur fonction. Cependant, en réponse à une stimulation par des cellules tumorales telles que les cellules K562, par ADCC ou par liaison d'un anticorps sur le CD16, ces cellules NK ont une production de cytokines et une cytotoxicité réduites. De plus, une co-stimulation *in vitro* avec de l'IL-15 ou de l'IL-12 associée à l'IL-18 pendant 24h, n'active pas les fonctions des cellules NK. Ces résultats suggèrent que ces cellules sont dans un état « unlicensed » (Anfossi, N. et al. 2006).

ii. L'hypothèse « arming » ou « stimulatory receptor »

Cette hypothèse postule que le « licensing » des cellules NK est directement induit par l'interaction entre le récepteur inhibiteur et le CMH de classe I du Soi. Ainsi, le récepteur inhibiteur spécifique du CMH de classe I du Soi agirait comme récepteur activateur pour initier le « licensing ». Ce modèle implique donc qu'une cellule qui interagit avec le CMH de type I du Soi soit armée pour lutter contre les cellules exprimant pas ou peu le CMH de classe I du Soi (**Figure 42**). Chez la souris, le motif ITIM du récepteur inhibiteur Ly49, qui reconnaît le CMH de type I du Soi, est nécessaire pour le « licensing » des cellules NK. Cependant, les molécules agissant en aval n'ont pas été identifiées et le mécanisme par lequel le récepteur inhibiteur est capable d'induire un effet positif reste à découvrir (Jonsson, A.H. and Yokoyama, W.M. 2009).

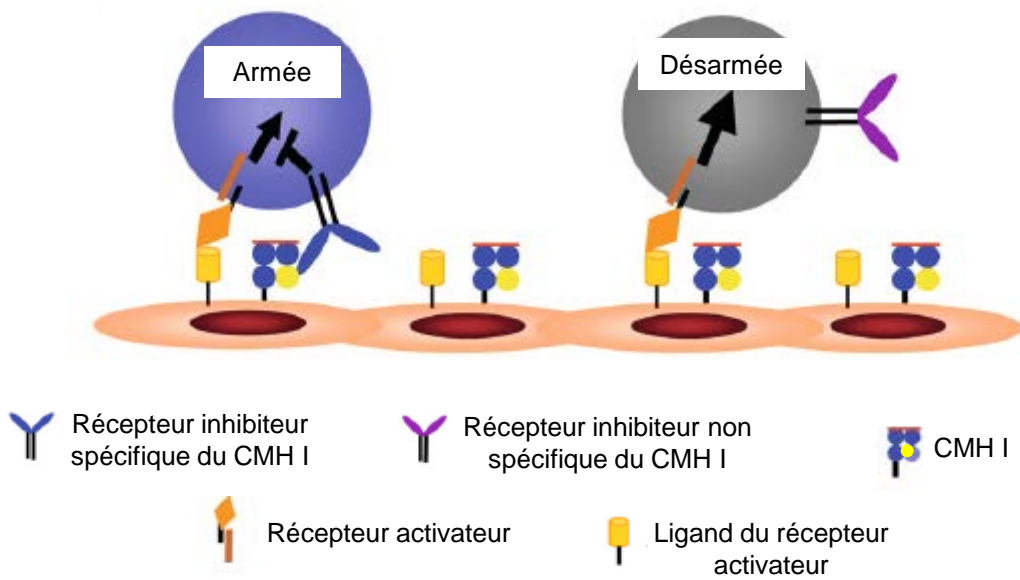


Figure 43 : **Education des cellules NK: hypothèse « disarming »**
 (D'après Jonsson, A.H. and Yokoyama, W.M. 2009)

iii. L'hypothèse « disarming » ou « inhibitory receptor »

Ce modèle stipule qu'après la fixation sur son ligand, le récepteur spécifique du CMH de classe I du Soi des cellules NK inhibe le signal activateur constitutif afin d'induire le « licensing ». En d'autres termes, le récepteur spécifique du CMH de classe I du Soi agit comme un récepteur inhibiteur en contrecarrant le signal d'un second récepteur qui vraisemblablement reconnaît le Soi et active les cellules NK. Cependant, lorsque les cellules environnantes n'expriment pas le CMH de type I du Soi ou lorsque les récepteurs KIR portés par la cellule NK n'ont pas de ligand, la cellule NK recevrait une somme importante de signaux non contrebalancés par des signaux inhibiteurs. Cette sur-activation aboutirait à un état d'anergie ou « unlicensed » caractérisé par des altérations fonctionnelles des cellules NK (**Figure 43**). Ce modèle nécessite donc l'engagement d'un récepteur activateur. Cependant, des souris déficientes pour les molécules adaptatrices DAP10, DAP12, FcR γ et CD3 ζ ont un « licensing » intact suggérant qu'aucune d'entre elles ne serait nécessaire au « licensing ». Néanmoins, ces souris sont déficientes seulement pour l'une des protéines adaptatrices, par conséquent un rôle redondant des récepteurs activateurs n'est pas à exclure (Jonsson, A.H. and Yokoyama, W.M. 2009).

iv. L'hypothèse « rhéostat »

La population de cellules NK se divise en un grand nombre de sous-populations exprimant des combinaisons variées de récepteurs inhibiteurs et de récepteurs activateurs. Chaque récepteur inhibiteur peut se fixer sur une ou plusieurs molécules du CMH de classe I avec des affinités variables (Hanke, T. et al. 1999) et chaque molécule du CMH de type I exerce un effet distinct sur l'éducation des cellules NK (Johansson, S. et al. 2005; Yu, J. et al. 2007). Ces résultats suggèrent que les récepteurs inhibiteurs qui reconnaissent le CMH de classe I du Soi engendrent une inhibition fonctionnelle plus ou moins prononcée. De plus, comme les récepteurs inhibiteurs, les récepteurs activateurs sont aussi capables de se lier aux cellules saines. Par conséquent, chaque cellule NK qui rencontre une cellule saine agit différemment en fonction de ses récepteurs inhibiteurs et activateurs (Joncker, N.T. and Raulet, D.H. 2008).

Ce modèle de « rhéostat » propose donc que des aspects quantitatifs (nombre de récepteurs différents engagés) et qualitatifs (puissance de chaque interaction) contrôlent l'impact d'une molécule donnée du CMH de classe I sur l'éducation des cellules NK (Joncker, N.T. and Raulet, D.H. 2008). Les cellules NK seraient éduquées en fonction du nombre de récepteurs activateurs et inhibiteurs exprimés à leur surface et selon l'expression des ligands correspondants à la surface des cellules hôtes en conditions basales. Après contact avec une cellule saine, les cellules NK recevraient donc un ensemble de signaux inhibiteurs et activateurs dont elles feraient la somme afin d'établir un seuil de tolérance. Chaque cellule NK possède son propre seuil de tolérance selon les récepteurs et leurs

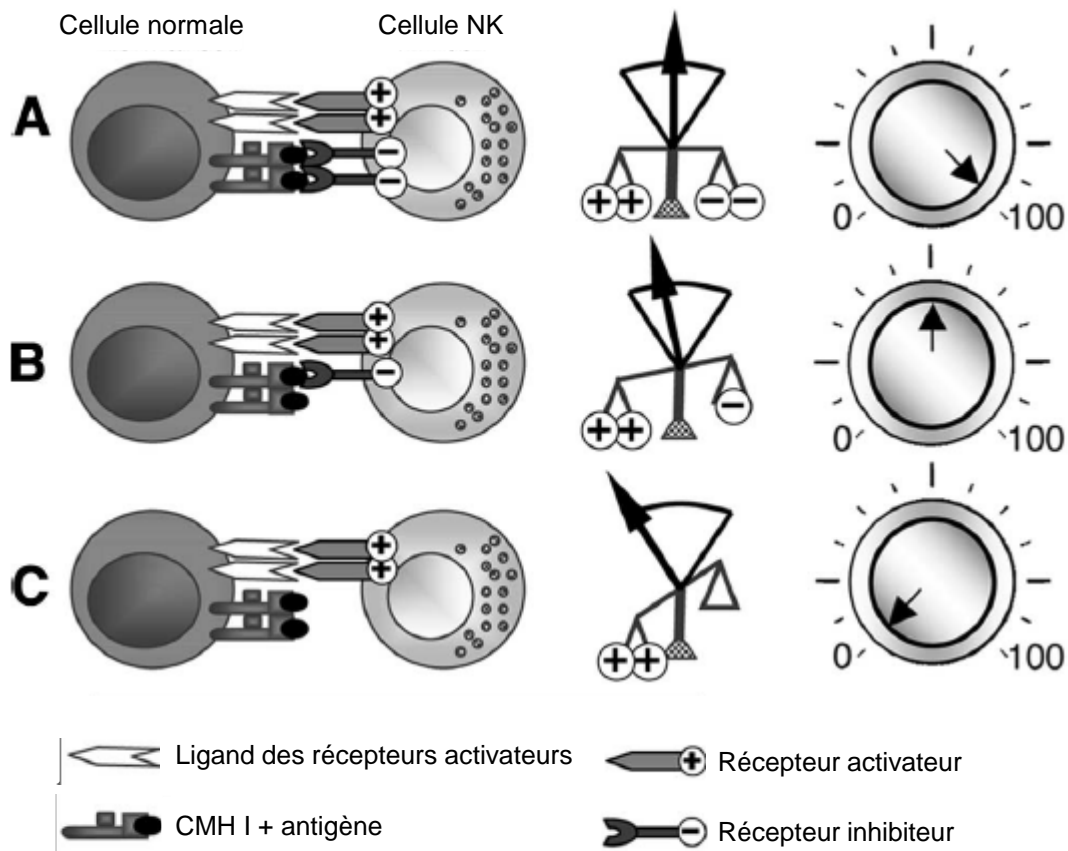


Figure 44 : **Education des cellules NK: hypothèse rhéostat**

Au cours de leur développement les cellules NK sont exposées aux ligands inhibiteurs et activateurs des cellules normales (colonne de gauche). La balance entre les signaux inhibiteurs et activateurs induit par les cellules normales (colonne du milieu) détermine le potentiel de réponse des cellules NK lorsqu'elles rencontreront une cellule stressée (colonne de droite).

A Les cellules NK expriment autant de récepteurs inhibiteurs que de récepteurs activateurs ce qui lui confère un fort potentiel de réponse.

B L'expression de récepteurs inhibiteurs par les cellules NK est moins importante que les récepteurs activateur induisant une inhibition partiel du potentiel de réponse.

C Les cellules NK n'expriment pas de récepteur inhibiteur ce qui engendre un faible potentiel de réponse.

(D'après Joncker, N.T. et al. 2009)

ligands correspondants exprimés sur la cellule hôte. Ainsi, lorsque les cellules NK seront confrontées à des cellules du Soi ayant une expression altérée des ligands des récepteurs activateurs et/ou inhibiteurs, les signaux reçus dépasseront le seuil de tolérance et les cellules NK les détruiront par lyse. Cependant, le seuil n'étant pas le même pour toutes les cellules NK, la capacité de réponse vis-à-vis d'une cellule cible donnée est différente (**Figure 44**). En effet, les cellules NK n'exprimant pas de récepteurs inhibiteurs sont insensibles à la perte du CMH de classe I à la surface des cellules cibles. Néanmoins, elles sont capables de répondre aux cellules cibles qui expriment fortement des ligands activateurs (Joncker, N.T. and Raulet, D.H. 2008; Joncker, N.T. et al. 2009; Jonsson, A.H. and Yokoyama, W.M. 2009). Ce modèle de « rhéostat » complète mais, ne remplace pas les modèles « arming » et « disarming », il ne permet pas non plus de discriminer l'un ou l'autre.

I-2-4-d Fonctions effectrices des cellules NK

La fonction principale des cellules NK est d'éliminer les cellules cancéreuses ou infectées par des virus *via* leur activité cytotoxique. Cependant, elles sont également capables de réguler la réponse immune grâce à leur production de cytokines et de chimiokines et leur interaction avec d'autres acteurs immunitaires (DC, LT effecteurs et les LT régulateurs).

Comme nous venons de le voir dans le paragraphe précédent, chaque cellule NK est éduquée de telle sorte qu'elle ne soit pas réactive vis-à-vis des cellules saines du Soi. La reconnaissance d'une cellule cible engendre la dégranulation de molécules cytotoxiques responsables de sa lyse. Afin de comprendre la fonction cytotoxique des cellules NK, il est donc important de déterminer, dans un premier temps, comment les vésicules cytotoxiques sont mobilisées pour relarguer leur contenu au sein de la cellule cible.

i. Formation et fonction de la synapse immunologique

La formation d'une synapse immunologique mature et fonctionnelle comprend trois étapes : l'initiation, la phase effectrice et la résiliation. Ces différentes étapes aboutissent à la libération du contenu des granules lytiques dans la synapse immunologique. Chacune est nécessaire pour prévenir une libération accidentelle des granules lytiques et pour effectuer la dégranulation au moment approprié.

- L'initiation

La mise en place d'une synapse immunologique débute par un contact entre une cellule cible et une cellule NK. En effet, en réponse à des signaux chimiotactiques, les cellules NK sont dirigées vers les sites où elles sont susceptibles de rencontrer des cellules cibles. Les molécules impliquées dans le contact cellule NK-cellule cible n'ont pas été formellement identifiées. Néanmoins, il semblerait que des sélectines soient impliquées (Chen, S. et al. 2005). Ce premier contact peut aboutir

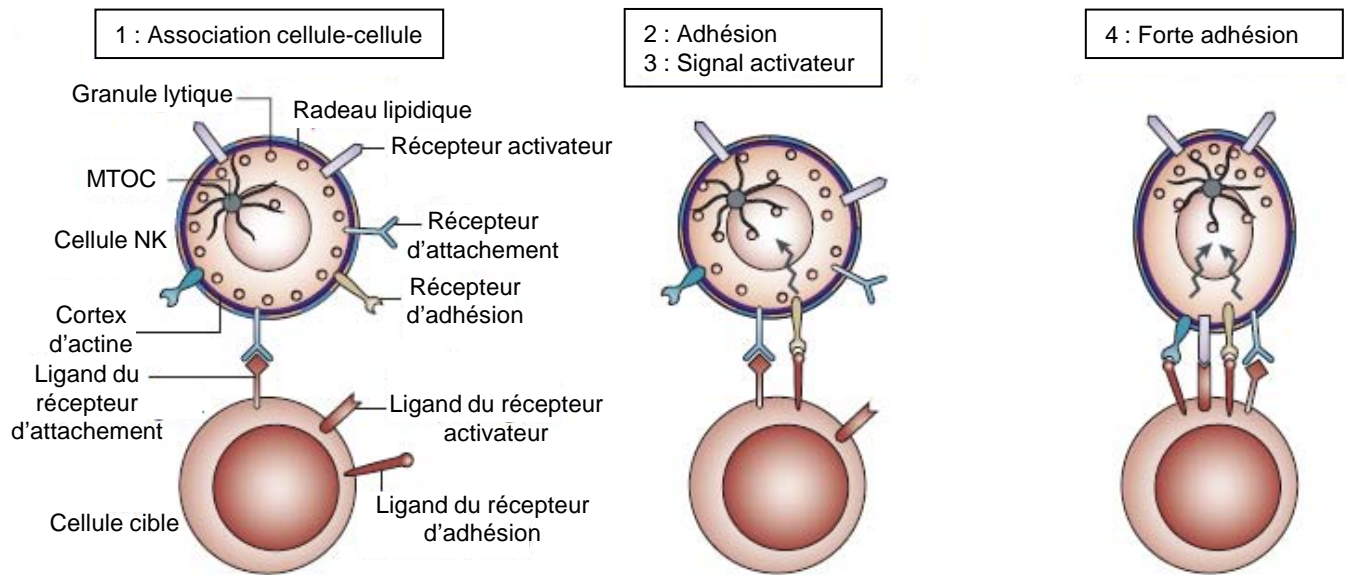


Figure 45 : **Etape d'initiation d'une synapse immunologique entre une cellule NK et une cellule cible**
(D'après Orange, J.S. 2008)

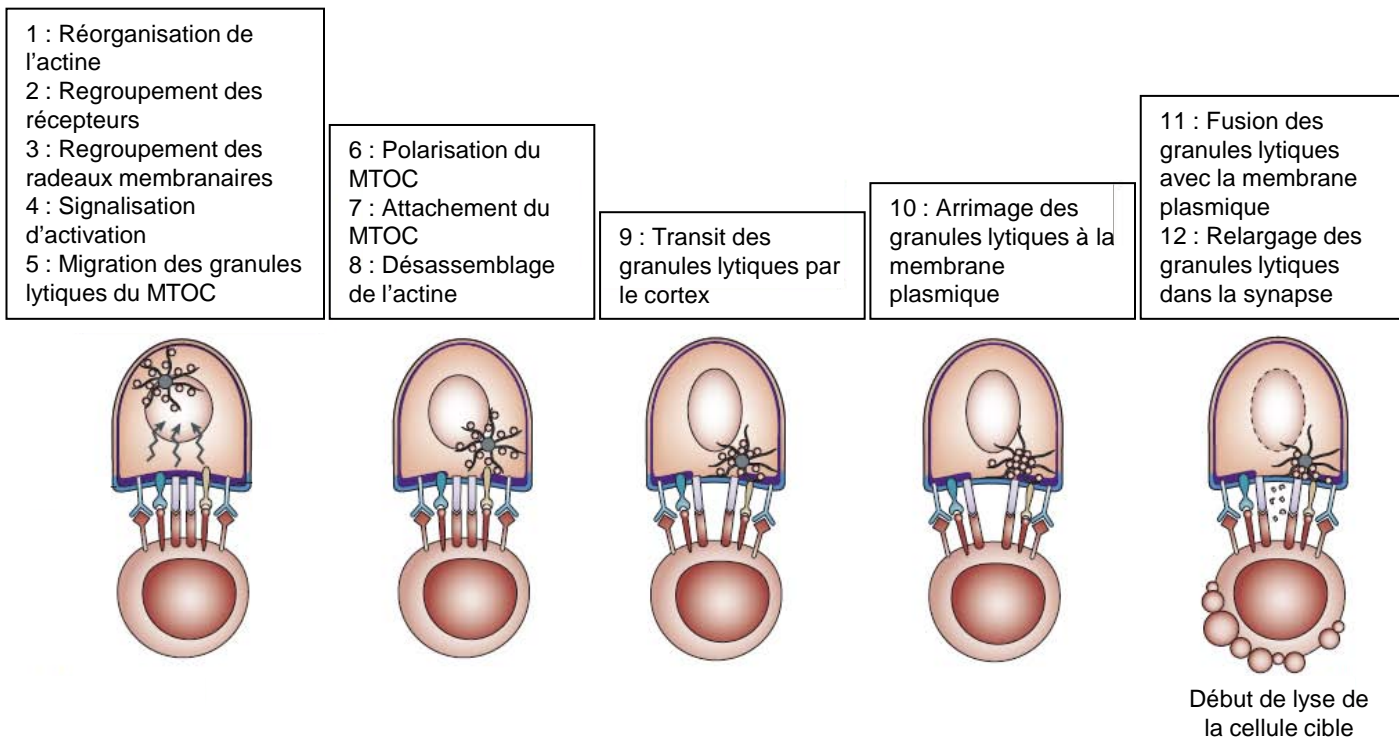


Figure 46 : **Etape effectrice d'une synapse immunologique entre une cellule NK et une cellule cible**
(D'après Orange, J.S. 2008)

à l'adhésion de la cellule NK sur sa cible *via* des interactions du type ligand-récepteur. Les molécules d'adhésion de la famille des intégrines telles que la LFA 1 et le « macrophage receptor 1 » MAC 1 interviennent dans ce processus d'adhésion (Vyas, Y.M. et al. 2001; Orange, J.S. 2008) et peuvent également jouer un rôle dans l'activation des cellules NK après la formation de la synapse immunologique (Barber, D.F. et al. 2004; Orange, J.S. 2008) (**Figure 45**). Suite à l'adhésion de la cellule NK sur la cellule cible et en l'absence de signaux inhibiteurs, la phase effectrice peut se mettre en place.

- L'étape effectrice

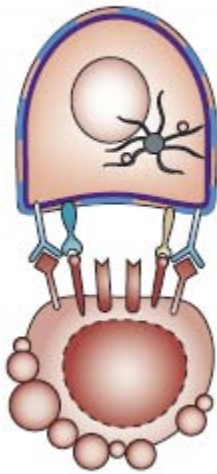
Cette phase débute par la réorganisation du cytosquelette d'actine (Carpen, O. et al. 1983) qui est dépendante des protéines du syndrome Wiskott-Aldrich (« Wiskott-Aldrich syndrome proteins » (WASP)). En effet, ces dernières orchestrent la restructuration des filaments d'actine afin de modifier la forme de la cellule NK (Orange, J.S. et al. 2002). En parallèle de la réorganisation du cytosquelette, l'accumulation de récepteurs tels que le LFA-1 et le MAC 1 et de radeaux lipidiques au niveau de la synapse, et une redistribution des granules lytiques dans les cellules NK s'opèrent (**Figure 46**).

En absence de polymérisation des filaments d'actine les récepteurs LFA-1 et MAC 1 ne s'accumulent pas au niveau de la synapse (Orange, J.S. 2008). Les mécanismes par lesquels l'actine provoque leur accumulation au niveau de la synapse sont mal connus. Toutefois, des protéines de la famille « ezrin, radixin et moesin » (EMR) impliquées dans la mobilité de récepteurs dans d'autres types cellulaires (Helander, T.S. et al. 1996; Ilani, T. et al. 2007) sont retrouvées au niveau de la synapse (Ramoni, C. et al. 2002; McCann, F.E. et al. 2003).

L'accumulation des radeaux lipidiques au niveau des synapses est également dépendante de la polymérisation d'actine (Masilamani, M. et al. 2006). Les radeaux lipidiques constituent des micro-domaines membranaires enrichis en sphingolipides, cholestérol et glycolipides qui de part leur structure ordonnent la bicouche lipidique en incluant ou excluant des molécules et des complexes de signalisation (Simons, K. and Ikonen, E. 1997; Brown, D.A. and London, E. 2000). La plupart des techniques pour étudier les radeaux lipidiques sont indirectes, et par conséquent, leur pertinence et leur fonction dans la réponse immunologique restent controversées (Munro, S. 2003).

La polarisation des granules lytiques vers la synapse commence par la migration des granules le long des microtubules du « microtubule organizing centre » (MTOC). Une fois agrégés autour du MTOC, les granules débutent leur migration vers la synapse. Cette dernière nécessite la phosphorylation d'« extracellular signal regulated » kinases (ERK) (Chen, X. et al. 2006) ainsi que l'activation de VAV 1 (Graham, D.B. et al. 2006) et de la « proline-rich tyrosine » kinase 2 (PYK 2) (Sancho, D. et al. 2000). Arrivés à la synapse, quelques filaments d'actine se désagrègent afin de créer un conduit par lequel les granules lytiques auront accès à la membrane plasmique de la cellule NK

1 : Période d'inactivité
2 : Sous-expression des récepteurs



3 : Détachement
4 : Restauration du potentiel cytolytique

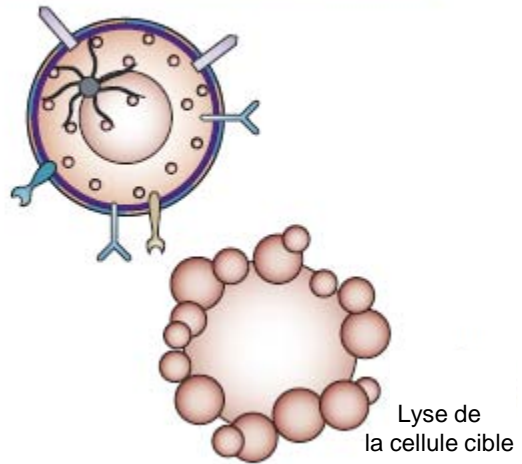


Figure 47 : **Etape de résiliation d'une synapse immunologique entre une cellule NK et une cellule cible**
(D'après Orange, J.S. 2008)

(**Figure 46**). La fonction de ce conduit reste hypothétique, cependant, sa présence a fréquemment été observée dans différentes études *in vitro* (Vyas, Y.M. et al. 2001; Andzelm, M.M. et al. 2007). Le mécanisme responsable du désassemblage des filaments d'actine est mal connu et serait indépendant de la polarisation de MTOC (Orange, J.S. 2008).

Ensuite, les granules lytiques s'arriment au niveau de la membrane plasmique de la cellule NK avec laquelle ils fusionnent et ils libèrent leur contenu dans la fente synaptique (Liu, D. et al. 2005). La fusion entre les deux membranes est dépendante de récepteurs appelés « soluble NSF attachment protein receptors » (SNARE) exprimés au niveau de la membrane plasmique et de la membrane des vésicules intracellulaires (Jahn, R. et al. 2003). Selon leur fonction et leur localisation les SNAREs sont divisés en deux groupes : le premier dénommé v-SNARE (vesicular-SNARE) situé au niveau des granules, des vésicules de sécrétion et autres compartiments intracellulaires et le second du nom de t-SNARE (target-SNARE) associé à la membrane de la cellule cible telle que la membrane plasmique dans le cas de l'exocytose (Fasshauer, D. et al. 1998). Une interaction entre v-SNARE et t-SNARE est nécessaire à la fusion des membranes. Des études ont montré la présence, dans les cellules NK, de v-SNAREs appelés VAMP 7 (vesicle-associated membrane 7) (Marcet-Palacios, M. et al. 2008) et de t-SNARE nommés syntaxin 11 (Arneson, L.N. et al. 2007). La molécule VAMP 7, présente dans les granules lytiques, participe à la fusion des membranes (Marcet-Palacios, M. et al. 2008) alors que syntaxin 11 est impliquée dans leur dégranulation (Arneson, L.N. et al. 2007).

- La résiliation

La dégranulation des vésicules lytiques est suivie d'une période d'inactivité de la cellule NK au cours de laquelle la synapse immunologique reste stable (**Figure 47**). La durée serait de 45 min après l'adhésion de la cellule NK sur la cellule cible (McCann, F.E. et al. 2003). Cette période d'inactivité pourrait permettre d'accroître le temps d'exposition de la cellule cible aux molécules lytiques et de protéger les cellules voisines vis-à-vis de ces granules.

Ensuite, les récepteurs activateurs tels que NKG2D, 2B4 et NKp46 sont sous-exprimées (Sandusky, M.M. et al. 2006; McCann, F.E. et al. 2007; Orange, J.S. 2008) (**Figure 47**) afin que la cellule NK puisse se désunir de la cellule cible. D'autres mécanismes similaires à ceux décrits dans les lymphocytes T doivent être impliqués dans ce processus de détachement. En effet, la protéine kinase C θ (PKC θ) qui participe à la déstabilisation de la synapse des cellules T (Sims, T.N. et al. 2007), est également retrouvée dans la fente lytique des cellules NK (Vyas, Y.M. et al. 2001) où elle pourrait, à ce titre, jouer un rôle identique.

Après s'être séparées des cellules cibles, les cellules NK sont capables de restaurer leur potentiel cytotoxique en générant de nouveaux granules lytiques et en ré-exprimant des récepteurs activateurs (**Figure 47**). Des études suggèrent, que les cellules NK ont la capacité de former une

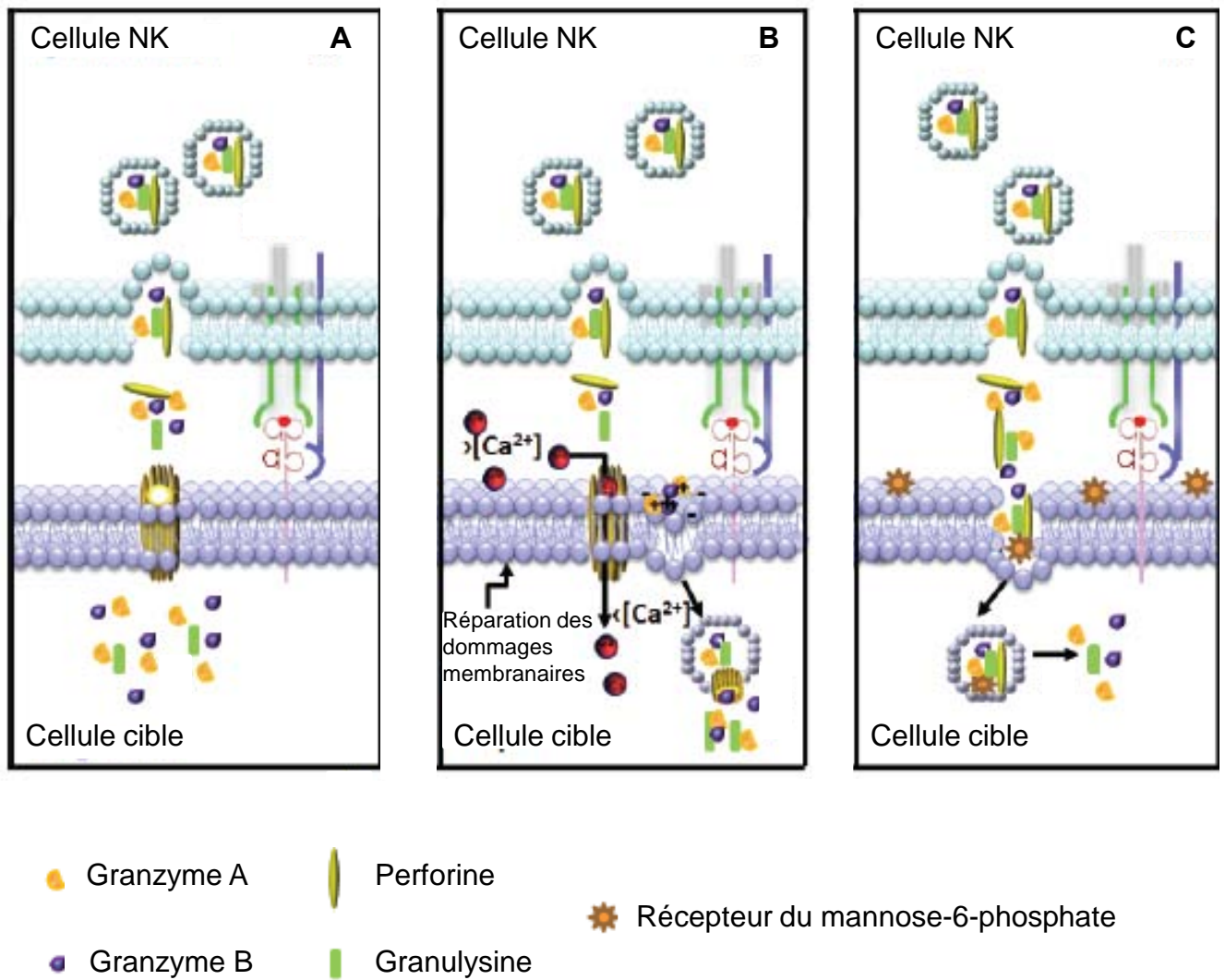


Figure 48 : Cytotoxicité des cellules NK par la voie dépendante de l'exocytose des granules lytiques
(D'après Chavez-Galan, L. et al. 2009)

nouvelle synapse immédiatement après détachement de la première synapse (Ullberg, M. and Jondal, M. 1981; Bhat, R. and Watzl, C. 2007). Les signaux initiateurs du processus de recyclage des capacités cytotoxiques des cellules NK ne sont pas connus mais, pourraient dériver de la synapse immunologique. En effet, la liaison du récepteur NKp30 avec son ligand, induit l'activation de NF- κ B (nuclear factor- κ B) (Pandey, R. et al. 2007) qui agit comme un facteur de transcription pour l'expression du gène de la perforine (Zhou, J. et al. 2002).

ii. Les mécanismes de cytotoxicité des cellules NK

La reconnaissance de la cellule cible aboutit donc à la formation d'une synapse immunologique dans laquelle les cellules NK vont libérer le contenu de leurs granules lytiques. Ce phénomène est appelé cytotoxicité naturelle. Dans ce cas, les cibles des cellules NK sont des cellules tumorales ou des cellules infectées. Les cellules NK peuvent également reconnaître des cellules opsonisées par les IgG *via* leur CD16. Ces dernières seront alors lysées par ADCC suite à la dégranulation des cellules NK. Outre la voie dépendante de l'exocytose des granules lytiques, une voie faisant intervenir des interactions entre les récepteurs de mort de la famille du TNF et leurs ligands conduit à l'apoptose de la cellule cible. Par ces différents mécanismes cytotoxiques, les cellules NK jouent un rôle important dans l'immunosurveillance des tumeurs et le contrôle de certaines infections virales ou bactériennes.

- La voie dépendante de l'exocytose des granules lytiques : la cytotoxicité naturelle et ADCC

Même si ces deux mécanismes reconnaissent la cellule cible de manière différente, ils conduisent tout les deux à la mort de la cellule cible sous l'action des molécules lytiques libérées par les cellules NK. La perforine et le granzyme B sont les molécules les plus abondantes des granules lytiques et le granzyme B est considéré comme l'effecteur majeur de la cytotoxicité des cellules NK (Mahrus, S. and Craik, C.S. 2005). D'autres granzymes (A, H, K et M) ainsi que de la granulysine sont également retrouvés (Mahrus, S. and Craik, C.S. 2005; Latinovic-Golic, S. et al. 2007; Cullen, S.P. and Martin, S.J. 2008).

La perforine, une fois ancrée à la membrane de la cellule cible, se polymérise en présence de calcium afin de former des pores cylindriques de 5 à 20 nm de diamètre (Sauer, H. et al. 1991; Voskoboinik, I. et al. 2005), facilitant l'entrée passive des granzymes et de la granulysine à l'intérieur de la cellule cible (Chavez-Galan, L. et al. 2009). Ces pores pourraient également être responsables d'un échange ionique à l'origine d'un déséquilibre osmotique (Liu, C.C. et al. 1995) (**Figure 48A**). Un autre mécanisme impliquant la perforine et permettant l'entrée des granzymes et de la granulysine dans la cellule cible a été suggéré. Les pores formés par la perforine favorisent l'entrée de calcium dans la cellule cible. Le calcium provoque ainsi l'activation de cette dernière qui en retour répare les dommages membranaires afin d'éviter la nécrose. Les granzymes ayant adhéré par électrostatisme à

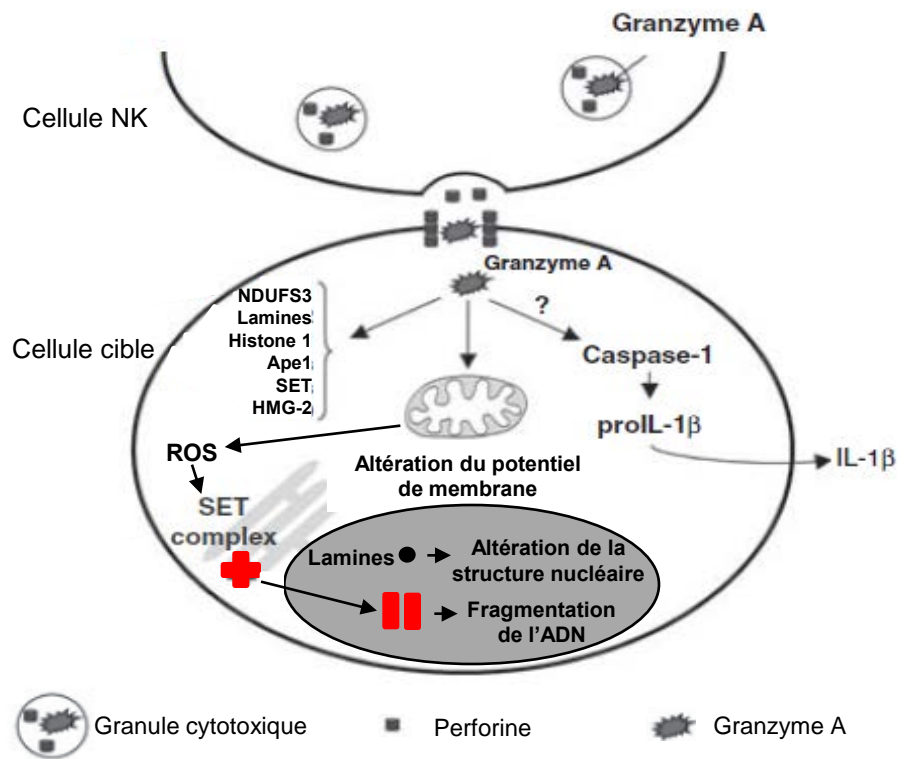


Figure 49 : **Induction de la mort cellulaire par le granzyme A des cellules NK**
(D'après Cullen, S.P. et al. 2010)

la surface des cellules cibles sont alors internalisés avec la perforine et libérés dans le cytoplasme (Keefe, D. et al. 2005) (**Figure 48B**). Outre la perforine, le récepteur du mannose-6-phosphate est capable de former un complexe avec le granzyme B. Ce dernier est internalisé dans la cellule cible et libère par la suite le granzyme B (Motyka, B. et al. 2000) (**Figure 48C**). Cependant, une autre étude démontre que le récepteur du mannose-6-phosphate n'est pas nécessaire à l'entrée du granzyme B à l'intérieur de la cellule cible (Trapani, J.A. et al. 2003). De plus, des modèles expérimentaux de souris déficientes en perforine montrent que cette protéine est cruciale pour la cytotoxicité médiée par les granzymes. En effet, chez ces souris, les granzymes sont incapables de pénétrer dans les cellules cibles provoquant une perte totale de la fonction cytotoxique des cellules NK (Voskoboinik, I. and Trapani, J.A. 2006; Bolitho, P. et al. 2007).

Une fois entrés dans la cellule cible, les granzymes et la granulysine vont induire la mort cellulaire. Parmi les différents granzymes (A, B, H, K et M) exprimés dans les cellules NK, les granzymes A et B ont été les plus étudiés (Russell, J.H. and Ley, T.J. 2002). Les granzymes sont des protéines solubles appartenant à la famille des sérine-protéases. Ils induisent l'apoptose des cellules cibles *via* des voies caspases dépendantes ou indépendantes (Waterhouse, N.J. et al. 2006).

Le granzyme A est un tryptase qui provoque l'apoptose indépendamment de la voie des caspases. Il induit un processus de mort cellulaire lente par clivage de l'ADN en fragments simple brin et par l'hydrolyse de protéines contenant des acides aminés basiques tels que l'arginine ou la lysine (Fan, Z. et al. 2003). Cette apoptose est précédée d'une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'une diminution du potentiel de membrane mitochondrial (Fan, Z. et al. 2003; Martinvalet, D. et al. 2005). En effet, le granzyme A, de part le clivage de la protéine mitochondriale NDUF3 qui appartient au complexe I de la chaîne respiratoire de transport d'électrons, participe à l'altération de la fonction redox de la mitochondrie, de la génération d'ATP et du potentiel transmembranaire de la mitochondrie (Martinvalet, D. et al. 2005; Martinvalet, D. et al. 2008). Cela génère des ROS qui activent un complexe du réticulum endoplasmique (complexe SET) composé de deux protéines suppresseurs de tumeur, la phosphoprotéine 32 (pp32) et la protéine « nonmetastatic 23 homologue 1 » (NM23-H1) et de trois substrats du granzyme A : l'oncoprotéine SET, la protéine « high motility group 2 » (HMG-2) et l'endonucléase « apurinic 1 » (Ape1) (Fan, Z. et al. 2003; Martinvalet, D. et al. 2005). Une fois activé, le complexe SET entre dans le noyau où il est clivé par le granzyme A provoquant non seulement l'inactivation d'Ape1 et d'HMG-2, deux protéines impliquées dans la réparation de l'ADN mais, aussi le relargage de la nucléase NM23-H1 qui coupe l'ADN (Fan, Z. et al. 2003). Le granzyme A perturbe également l'enveloppe nucléaire par le clivage des lamines et de l'histone 1 rendant ainsi l'ADN plus accessible aux nucléases (Zhang, D. et al. 2001). Le granzyme A induit également la production d'IL-1 β *via* un mécanisme dépendant de la caspase 1 qui clive le pro-peptide IL-1 β (Irmeler, M. et al. 1995; Cullen, S.P. et al. 2010) (**Figure 49**).

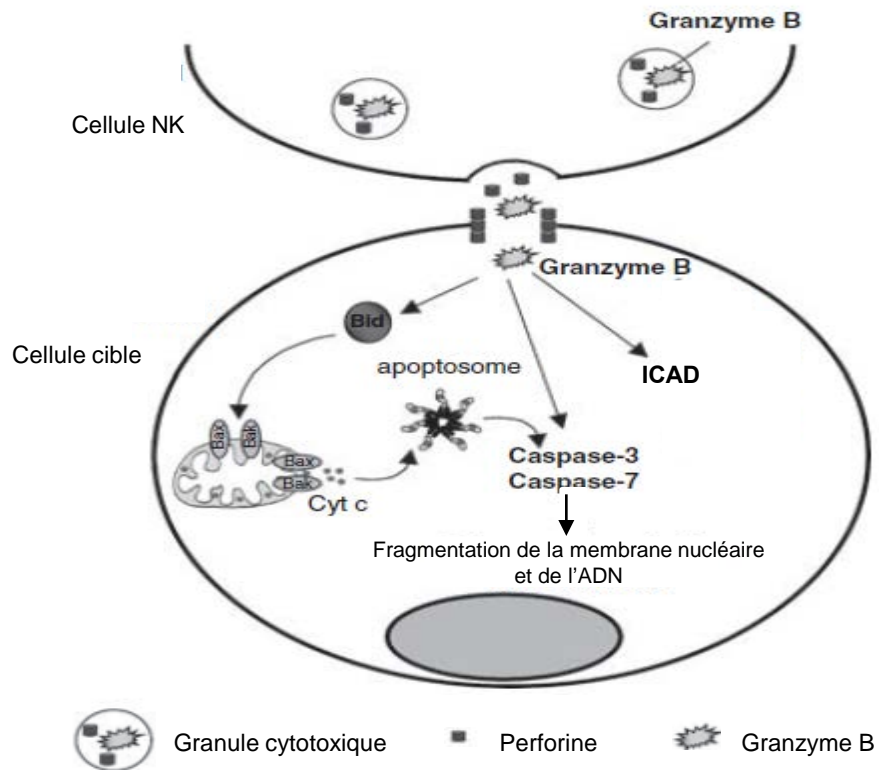


Figure 50 : **Induction de la mort cellulaire par le granzyme B des cellules NK**
 (D'après Cullen, S.P. et al. 2010)

Le granzyme A exerce aussi une activité extracellulaire. En effet, il est capable d'induire la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 par les fibroblastes (Sower, L.E. et al. 1996).

Le granzyme B est une sérine protéase clivant après des résidus d'aspartate et possédant les caspases comme substrat (Chowdhury, D. and Lieberman, J. 2008). Il induit une mort cellulaire rapide *via* deux voies. Dans la première, il clive la caspase 3 et la caspase 7, induisant une activation de caspases en cascade qui aboutit à la fragmentation de la membrane nucléaire et de l'ADN (Pinkoski, M.J. et al. 2001; Metkar, S.S. et al. 2003). Dans la seconde voie, le granzyme B clive la protéine Bid, formant ainsi une protéine Bid tronquée (tBid) active (Pinkoski, M.J. et al. 2001; Chowdhury, D. and Lieberman, J. 2008). Celle-ci recrute des protéines Bax et Bak au niveau de la membrane externe de la mitochondrie conduisant à la libération du cytochrome *c* par la mitochondrie (Cullen, S.P. and Martin, S.J. 2008). Le cytochrome *c* contribue à l'assemblage de l'apoptosome, structure qui active la caspase 9 et clive ultérieurement les caspases 2, 3, 6, 7, 8 et 10 et aboutit ainsi à la mort de la cellule cible (Metkar, S.S. et al. 2003; Cullen, S.P. and Martin, S.J. 2008) (**Figure 50**). Le granzyme B induit également le clivage de la protéine « inhibitor of caspase activated DNase » (ICAD) qui, en conditions basales, forme dans le cytoplasme un hétérodimère avec la protéine « caspase activated DNase » (CAD). Cela permet l'activation de CAD qui initie alors la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN. Les caspases 3 et 7 clivées par le granzyme B peuvent également activer la protéine CAD (Sakahira, H. et al. 1998; Thomas, D.A. et al. 2000).

Les granules lytiques contiennent également d'autres granzymes, dont les fonctions sont peu décrites. Le granzyme K est une tryptase qui engendre l'apoptose *via* le clivage de la protéine Bid (Zhao, T. et al. 2007). Le granzyme H est un chymotryptase qui semble avoir des fonctions synergiques avec le granzyme B (Andrade, F. et al. 2007). Le granzyme M est une sérine protéase très exprimée dans les cellules NK et qui conduit à la mort cellulaire sans fragmentation de l'ADN (Kelly, J.M. et al. 2004). Il désorganise le réseau des microtubules en clivant des protéines d'actine qui font le lien entre le plasma et la membrane tels que les microtubules contenant de l' α -tubuline (Bovenschen, N. et al. 2008).

La granulysine, structurellement similaire à la saposine, intervient également dans l'apoptose des cellules cibles. Elle est retrouvée sous une forme de 15kDa et une forme de 9kDa. Cette dernière est issue du clivage du précurseur de 15kDa et est la seule forme dotée d'une activité cytolytique (Latinovic-Golic, S. et al. 2007). Du fait de sa structure, la granulysine se lie avec les lipides chargés négativement de la membrane mitochondriale et induit des dommages membranaires (Latinovic-Golic, S. et al. 2007). Ce mécanisme provoque le relargage de cytochrome *c* et réduit la fonction mitochondriale (Kaspar, A.A. et al. 2001). De plus, la présence de perforine stimule la lyse granulysine dépendante (Walch, M. et al. 2007). Outre la lyse *via* la libération du cytochrome *c*, la granulysine peut induire la mort cellulaire par l'activation de la caspase 3 (Kaspar, A.A. et al. 2001).

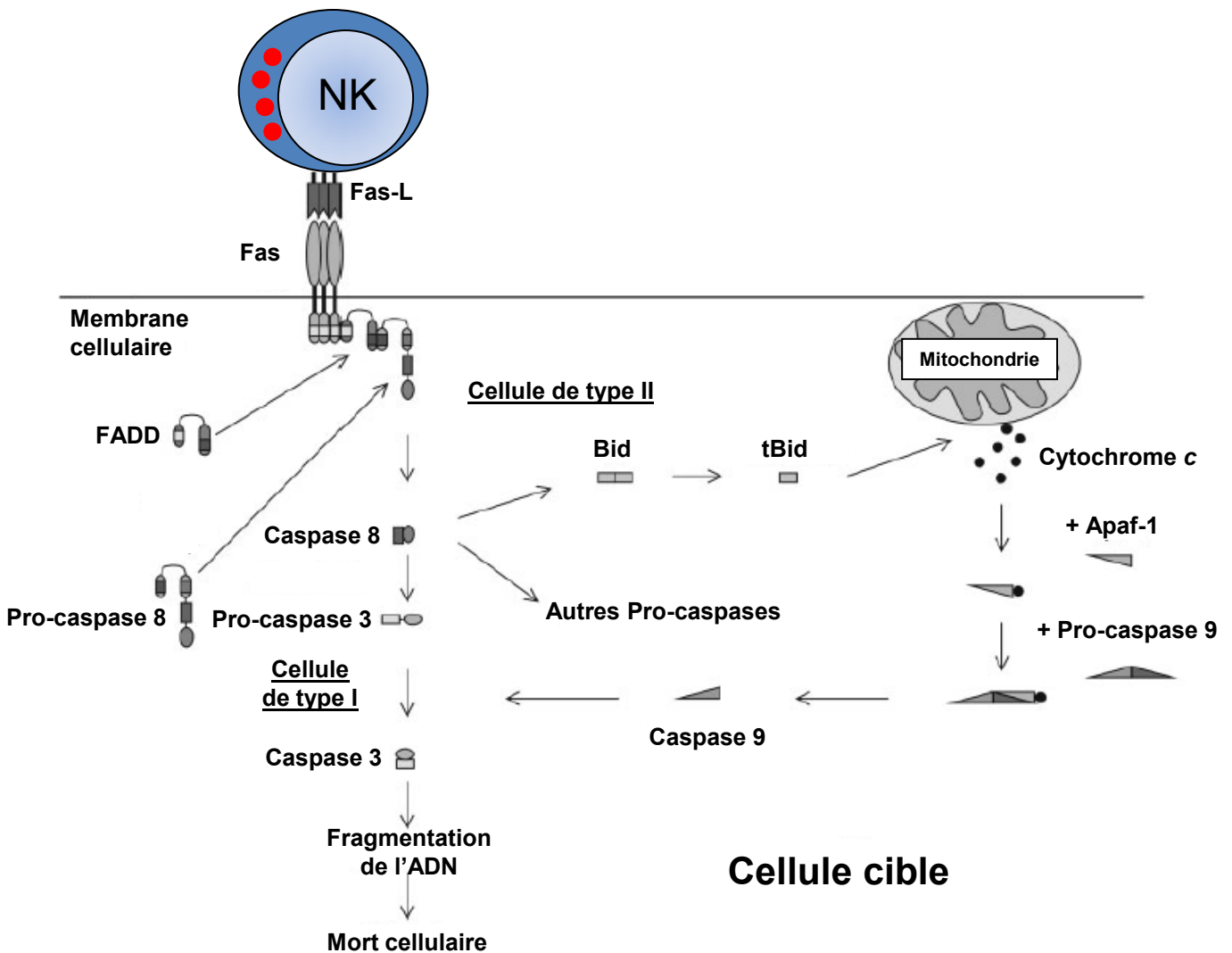


Figure 51 : Voies de signalisation impliquées dans l'apoptose induite par le récepteur de mort Fas
(D'après Timmer, T. et al. 2002)

Les fonctions de la granulysine ne se limitent pas à induire l'apoptose. En effet, à faibles concentrations et dans un environnement inflammatoire, elle attire et active les monocytes, les cellules T mémoires, les cellules NK et les DC myéloïdes (ou matures) (mDC) (Deng, A. et al. 2005). Le taux sérique de granulysine est un bon marqueur du statut immunologique des patients atteints de carcinome gastrique (Saigusa, S. et al. 2007).

- Les voies indépendantes de l'exocytose des granules lytiques : les voies des récepteurs de mort

Les cellules NK expriment à leur surface les ligands de récepteur de mort Fas-L et TRAIL de la famille du TNF. Ces molécules se fixent sur les récepteurs de mort de la cible, ce qui active la cascade des caspases et provoque l'apoptose des cellules cibles.

L'ARNm de Fas-L (CD178) est constitutivement exprimé par les cellules NK humaines. Son expression est augmentée suite à l'activation des cellules NK par le PMA et l'ionomycine ou par le CD16 en présence d'IL-2. Ces différentes stimulations accroissent également la cytotoxicité médiée par la voie Fas/Fas-L (Montel, A.H. et al. 1995; Eischen, C.M. et al. 1996). De plus, l'activation d'une lignée cellulaire de cellules NK (NKL) par la combinaison d'anticorps activateurs anti-LFA1 et anti-2B4 ou par le complexe PMA/ionomycine, stimule l'expression de Fas-L à la surface des cellules NKL (Chua, H.L. et al. 2004). L'expression de Fas-L par les cellules NK contribue à l'élimination de cellules tumorales *in vivo* (Bradley, M. et al. 1998). Des lignées de cellules tumorales dérivées de gliome (Fulda, S. et al. 1998a), de carcinome du colon (Tillman, D.M. et al. 1999), de carcinome mammaire (Ruiz-Ruiz, M.C. and Lopez-Rivas, A. 1999), de cancer de la prostate (Hedlund, T.E. et al. 1999), de neuroblastome (Fulda, S. et al. 1998b) et de médulloblastome (Fulda, S. et al. 1998a) expriment Fas (CD95 ou Apo-1). De plus, les cellules NK peuvent induire *via* la sécrétion d'IFN- γ l'expression de Fas à la surface des cellules cancéreuses. Ainsi, les cellules NK lysent ces cellules néoplasiques de façon Fas dépendante et cet effet peut être bloqué par des inhibiteurs d'apoptose (Screpanti, V. et al. 2001).

Au niveau de la transmission du signal, la fixation de Fas à Fas-L conduit à la trimérisation de Fas-L et au recrutement des protéines « fas-associated death domain » (FADD). Trois protéines FADD se lient entre elles et recrutent alors la pro-caspase 8 qui subit une autoprotéolyse et devient active. L'assemblage de ces composants résulte de la formation du « death-inducing signaling complex » (DISC) qui joue un rôle important dans l'apoptose dépendante des récepteurs de mort. La caspase 8 interagit avec les pro-caspases 3, 6, et 7 qui, une fois activées par un processus de trans-protéolyse, conduisent à la fragmentation de l'ADN (Carrington, P.E. et al. 2006) (**Figure 51**). La caspase 8 peut également hydrolyser la protéine Bid en tBid qui déclenche l'apoptose de la cellule cible *via* la voie dépendante de la mitochondrie (Li, H. et al. 1998; Timmer, T. et al. 2002) (**Figure 51**). Selon le mode d'induction de l'apoptose par la voie Fas/Fas-L, les cellules cibles ont été divisées en deux groupes, le

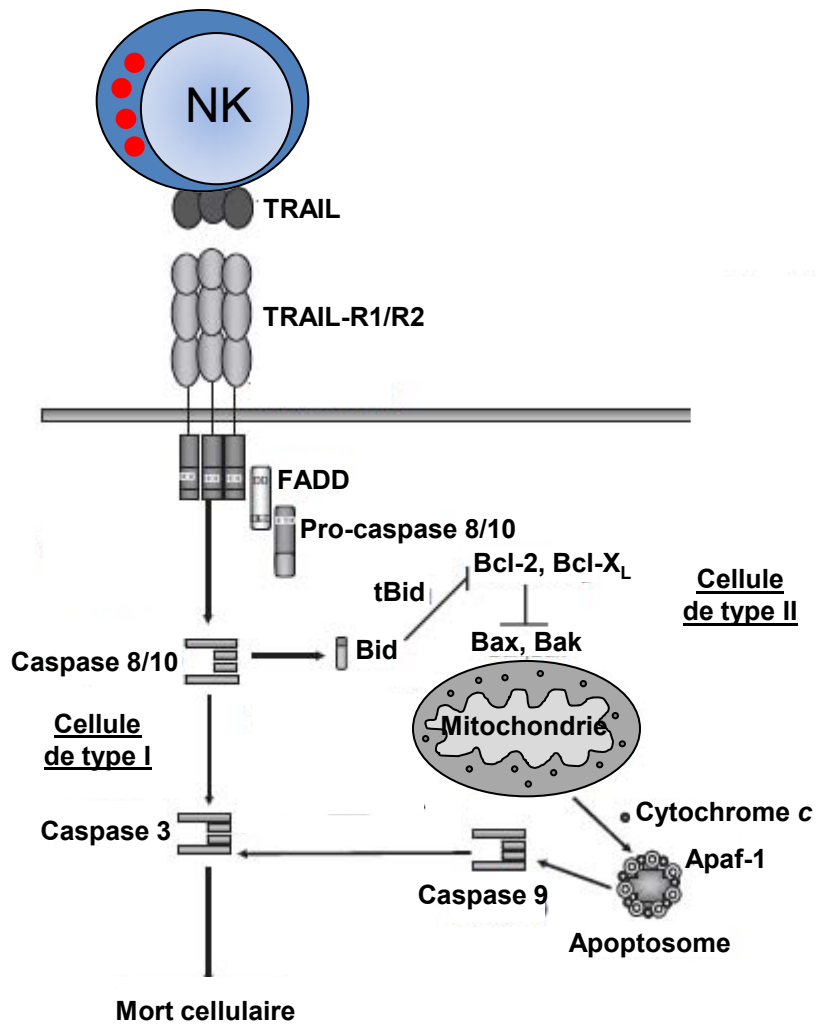


Figure 52 : Voies de signalisation impliquées dans l'apoptose induite par le récepteur de mort TRAIL-R
(D'après Falschlehner, C. et al. 2009)

type I et le type II. Ainsi, les cellules cibles de type I sont lysées rapidement après formation du DISC, alors que l'apoptose des cellules de type II est lente et dépendante de la mitochondrie (Scaffidi, C. et al. 1998). Dans les cellules de type I, Fas peut être internalisé dans un compartiment endosomal *via* une voie dépendante de l'actine et de la chlatrine permettant le recrutement de FADD et de la caspase 8 composant le DISC (Algeciras-Schimnich, A. and Peter, M.E. 2003) (**Figure 51**).

Les cellules NK humaines ou murines expriment fortement TRAIL (Apo-2L) à leur surface après stimulation par l'IL-2, l'IFN- γ , l'IFN- α/β ou l'IL-15. Cependant aucune expression constitutive de TRAIL n'est détectée sur les cellules NK non activées (Zamai, L. et al. 1998; Sato, K. et al. 2001; Smyth, M.J. et al. 2003). Chez l'homme quatre récepteurs membranaires de TRAIL (TRAIL-R1 à R4) et un récepteur soluble (TRAIL-R5) ont été identifiés. Seuls TRAIL-R1 (DR4) et TRAIL-R2 (DR5) sont capables d'induire la transduction du signal aboutissant à l'apoptose (Abdulghani, J. and El-Deiry, W.S. 2010). Les autres récepteurs pourraient servir de leurre, permettant ainsi de réguler la mort cellulaire médiée par TRAIL (Degli-Esposti, M. 1999). Au même titre que la perforine et Fas-L, TRAIL est en partie responsable de l'activité cytotoxique des cellules NK vis-à-vis de cellules tumorales sensibles à TRAIL (Smyth, M.J. et al. 2001a; Takeda, K. et al. 2001). La neutralisation de TRAIL accentue le développement tumoral de fibrosarcomes chez la souris ayant reçu une injection de 3-méthylcholanthrène et l'effet protecteur de TRAIL est en partie médié par les cellules NK et est totalement dépendant de la production d'IFN- γ par les cellules immunitaires (Cretney, E. et al. 2002; Takeda, K. et al. 2002). L'IFN- γ est capable de moduler la réponse anti-tumorale de TRAIL, non seulement en régulant l'expression de TRAIL à la surface des cellules effectrices mais, également en sensibilisant les cellules tumorales à la cytotoxicité médiée par TRAIL (Smyth, M.J. et al. 2003). La transduction du signal qui induit l'apoptose de la cellule cible est similaire à celle de la voie Fas/Fas-L. Ainsi, dans les cellules cibles de type I, la fixation de TRAIL sur TRAIL-R1 ou TRAIL-R2 provoque la trimérisation du récepteur et le recrutement de FADD qui conjointement avec la caspase 8 ou la caspase 10 forment le DISC (Walczak, H. and Haas, T.L. 2008). Ces caspases activent alors directement les caspases effectrices, dont la caspase 3, qui induisent la mort de la cellule cible (Abdulghani, J. and El-Deiry, W.S. 2010). Dans les cellules de type II, les caspases 8 et 10 clivent Bid en tBid qui engendre l'apoptose de la cellule cible *via* la voie dépendante de la mitochondrie (Falschlehner, C. et al. 2009; Abdulghani, J. and El-Deiry, W.S. 2010) (**Figure 52**).

iii. Les cellules NK dans l'immunité innée et adaptative

Les cellules NK de par leur production de chimiokines et de cytokines sont capables de moduler la réponse immunitaire. Certaines cellules de la réponse immune peuvent également être régulées suite à un contact direct avec les cellules NK.

- La production de chimiokines et de cytokines

Les chimiokines

In vitro, les cellules NK humaines circulantes non stimulées produisent les chimiokines CCL4, CCL5 et CCL22 et leur sécrétion est accrue en réponse à l'activation des cellules NK par diverses cytokines (Andrew, D.P. et al. 1998; Fehniger, T.A. et al. 1998). Les cellules NK sécrètent également d'autres chimiokines CCL1, CCL4 et CXCL8 après stimulation *in vitro* par des cytokines, par ULBP ou par des intégrines (Somersalo, K. et al. 1994; Fehniger, T.A. et al. 1998; Nieto, M. et al. 1998; Cosman, D. et al. 2001). Les chimiokines sécrétées permettent le recrutement d'autres types cellulaires tels que les LT CD4 et les LT CD8. En effet, le surnageant de cellules NK, préalablement activées par la combinaison d'IL-2 avec un anticorps anti-CD16, induit la migration *in vitro* des LT CD4 et des LT CD8. Le CXCL8 est en partie responsable de l'engagement des lymphocytes T puisque sa neutralisation avec un anticorps anti-CXCL8 inhibe de 60% cette migration (Somersalo, K. et al. 1994). Ces différentes chimiokines sont également impliquées dans le recrutement d'autres cellules NK. L'interaction des cellules NK avec les cellules cibles K562 stimule la production de CCL3, CCL4 et CCL5 et aboutit ainsi à une migration élevée des cellules NK (Nieto, M. et al. 1998). Par conséquent, de par leur production de chimiokines, les cellules NK participent non seulement à l'établissement mais aussi à l'amplification de la réponse immune.

Les cytokines

Parmi les cellules NK, les cellules NK CD56^{bright} sont la principale source de cytokines pro-inflammatoires et immunosuppressives dont l'IFN- γ , le TNF- β , l'IL-10, l'IL-13 et le GM-CSF. Après activation, les cellules NK CD56^{dim} sont également capables de sécréter ces cytokines mais, en très faibles quantités (Cooper, M.A. et al. 2001a; Cooper, M.A. et al. 2001b). La co-culture de cellules NK avec des macrophages, préalablement activés par du lipopolysaccharide pour la production de cytokines telles que l'IL-12, l'IL-15 et l'IL-18, induit une forte production d'IFN- γ par les cellules NK CD56^{bright} comparativement aux cellules NK CD56^{dim} (Cooper, M.A. et al. 2001a; Cooper, M.A. et al. 2001b). La production de cytokines de ces deux sous-populations de cellules NK a également été étudiée après activation par le PMA et l'ionomycine, un cocktail activateur des lymphocytes dont l'effet est indépendant des récepteurs de cytokines. Dans ces conditions, les cellules CD56^{bright} produisent davantage d'IFN- γ , de TNF- β et de GM-CSF que les cellules NK CD56^{dim}. Cela suggère que les cellules CD56^{bright} ont une capacité intrinsèque à produire de forts taux de cytokines comparativement aux cellules NK CD56^{dim} (Cooper, M.A. et al. 2001a; Cooper, M.A. et al. 2001b). La fonction majeure des cellules NK CD56^{bright} durant la réponse immune innée *in vivo* serait donc de fournir aux CPA dont les macrophages, de l'IFN- γ ainsi que d'autres cytokines. Cela induirait la production de cytokines par les CPA qui activeraient à leur tour les cellules NK. Cette boucle positive de production

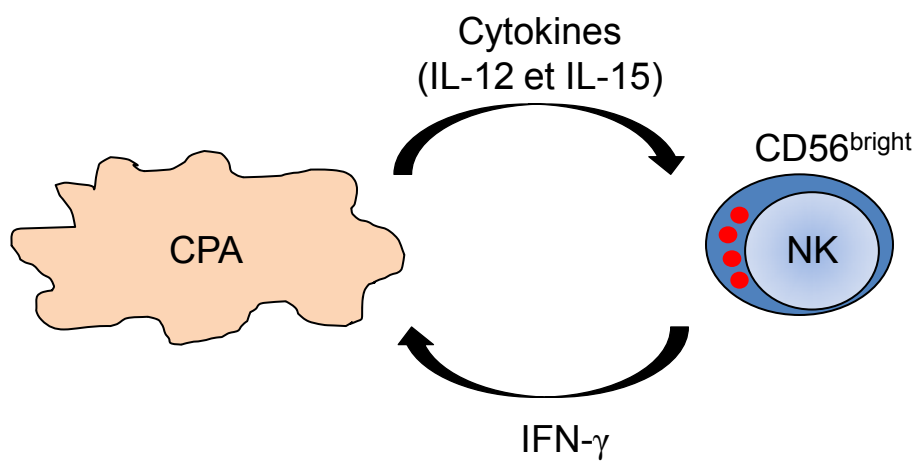


Figure 53 : **Modulation de la réponse immune innée par les sécrétions cytokiniques des cellules NK**
(D'après Cooper, M.A. et al. 2001a)

cytokinique permettrait le contrôle efficace de l'infection (Cooper, M.A. et al. 2001a) (**Figure 53**). Selon le type de stimulation, les cytokines produites par les cellules NK CD56^{bright} sont différentes. Ainsi, l'IL-12 et l'IL-18 constituent le stimulus optimal pour la production d'IFN- γ , alors que l'IL-15 et l'IL-18 provoquent une sécrétion maximale de GM-CSF. Enfin, l'IL-12 conjointement avec l'IL-15 induisent une expression optimale d'IL-10 par les cellules CD56^{bright} (Cooper, M.A. et al. 2001a; Cooper, M.A. et al. 2001b). Ceci suggère que la production de cytokines après une infection est du point de vue quantitatif et qualitatif importante dans la réponse sécrétoire cytokinique des cellules NK. Une classification des cellules NK basée sur le profil de sécrétion cytokinique a également été proposée et permet de distinguer deux sous-populations : les cellules NK1 et NK2 (Peritt, D. et al. 1998; Deniz, G. et al. 2002). *In vitro*, les cellules NK1 et NK2 sont obtenues après culture dans les conditions similaires à celles utilisées pour la différenciation des LT respectivement en lymphocytes T helper 1 (Th1) ou en lymphocytes T helper 2 (Th2). Les cellules NK1 et NK2 activées par le PMA et l'ionomycine ou un anticorps anti-CD16 sécrètent la même quantité de TNF- α et de GM-CSF. En revanche, les cellules NK1 produisent davantage d'IFN- γ et d'IL-10 et les cellules NK2 sécrètent des quantités plus importantes d'IL-13 et d'IL-5 (Peritt, D. et al. 1998). Cette différenciation en sous-populations NK1 et NK2 est également observée *in vivo* avec la présence au niveau circulant de cellules NK sécrétrices d'IFN- γ mais, n'exprimant quasiment pas l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-13 et des cellules NK2 non sécrétrices d'IFN- γ mais, produisant de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-13. Concernant l'activité cytotoxique, ces deux types de cellules lysent de façon similaire les cellules cibles K562 (Deniz, G. et al. 2002). Cette division des cellules NK en sous-population NK1 et NK2 est tout de même à considérer avec précaution puisque cette nomenclature est restreinte à quelques études. L'une d'entre elle réfute cette division et suggère plutôt que le profil de sécrétion de cytokines des cellules NK serait modifié au cours de leur développement (Loza, M.J. and Perussia, B. 2001).

- Les interactions avec les cellules dendritiques

Les interactions avec les iDC

Après recrutement au niveau des sites inflammatoires par différentes chimiokines, les cellules NK peuvent interagir avec d'autres acteurs de la réponse immune innée dont les cellules dendritiques (Moretta, A. et al. 2005). Ces interactions, qui modulent les fonctions des cellules NK, peuvent être soit directes avec un contact cellule-cellule soit indirectes *via* la production de cytokines (Trinchieri, G. 2003; Cooper, M.A. et al. 2004; Walzer, T. et al. 2005). Par exemple, après contact entre une DC myéloïde ou mature (mDC) et une cellule NK, la mDC sécrète de l'IL-12 qui stimule la production d'IFN- γ et la cytotoxicité de la cellule NK (Trinchieri, G. 2003). Une fois activées les cellules NK ont la capacité de lyser les cellules DC immatures (iDC) (Cooper, M.A. et al. 2004; Walzer, T. et al. 2005) qui sous-expriment les molécules du CMH de classe I. En d'autres termes, après internalisation de l'antigène, les cellules DC deviennent matures et expriment plus de molécules de CMH de type I que

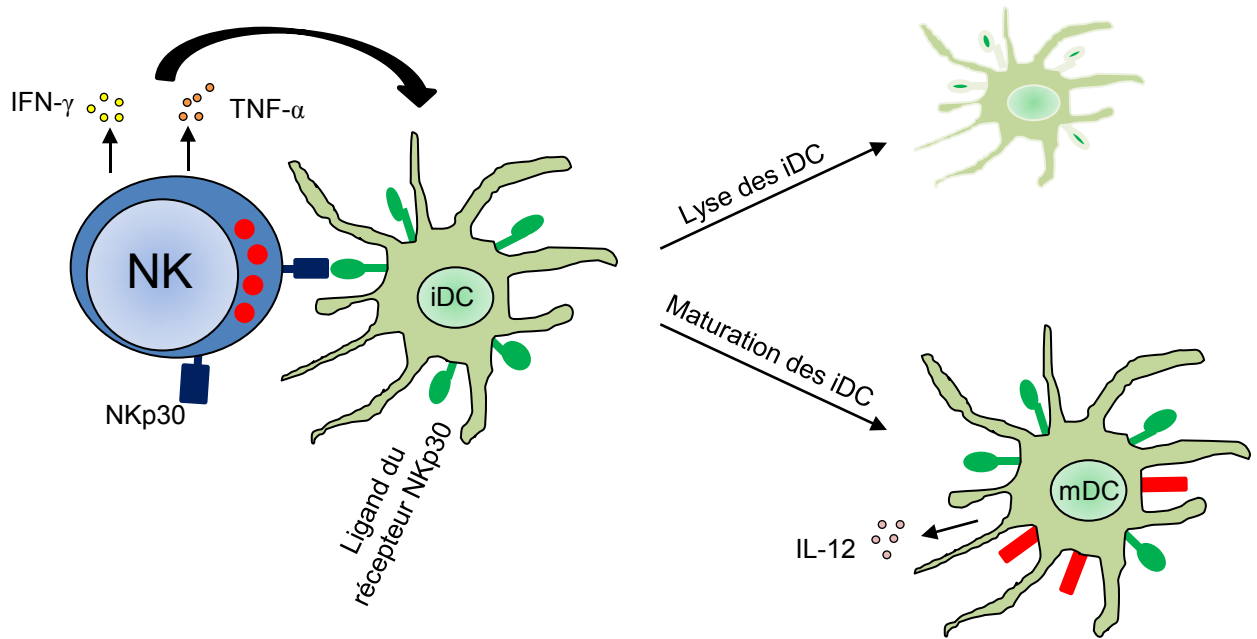


Figure 54 : **Différenciation et régulation des iDC par les cellules NK**
 (D'après Arnon, T.I. et al. 2006)

les iDC ce qui les rend résistantes à la lyse par les cellules NK activées (Ferlazzo, G. et al. 2003). Toutefois, une étude montre que la lyse des iDC n'est pas une fonction commune à toutes les cellules NK mais, est plutôt la propriété d'une population de cellules NK caractérisées par le phénotype de surface KIR⁺CD94/NKG2A⁺ (Della Chiesa, M. et al. 2003). Le récepteur CD94/NKG2A reconnaît des molécules non classiques du CMH de classe I, les HLA-E, qui sont sous-exprimées dans les iDC (Della Chiesa, M. et al. 2003). Durant le processus de maturation, les cellules DC sur-expriment également des molécules co-stimulatrices de la famille B7 et des récepteurs de chimiokines tel que CCR7. L'expression de ces molécules joue un rôle crucial dans la migration des cellules DC vers les nœuds lymphatiques et dans la présentation des antigènes aux LT (Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. 1999). Il a été suggéré, que la lyse des cellules DC par les cellules NK permettrait un maintien quantitatif et qualitatif du taux de cellules DC matures. Les cellules DC exprimant peu de molécules de CMH de classe I seront donc éliminées par les cellules NK (Moretta, A. 2005). Ainsi, les cellules NK peuvent prévenir la survie de cellules DC défectueuses qui, après expression de CCR7 et migration dans les nœuds lymphatiques, peuvent induire une présentation d'antigène inappropriée aux LT provoquant ainsi une réponse de type Th2 (Moretta, A. 2005). En effet, la déplétion, *in vivo*, des cellules NK *via* des anticorps induit une stimulation de la réponse de type Th2 au détriment de la réponse de type Th1 (Coudert, J.D. et al. 2002; Byrne, P. et al. 2004). Les récepteurs NKp30 et « DNAX accessory molecule-1 » (DNAM-1) exprimés à la surface des cellules NK jouent un rôle majeur dans la lyse des iDC (Arnon, T.I. et al. 2006; Pende, D. et al. 2006) (**Figure 54**). Leur blocage par des anticorps réduit fortement la lyse des iDC par les cellules NK (Arnon, T.I. et al. 2006; Pende, D. et al. 2006). De plus, chez des patients atteints de leucémie myéloïde aigue ou de syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), les cellules NK sous-expriment le récepteur NKp30 (Costello, R.T. et al. 2002; Mavilio, D. et al. 2005) et présentent par conséquent un défaut de lyse des iDC (Fauriat, C. et al. 2005; Mavilio, D. et al. 2006). L'élimination des cellules iDC par les cellules NK est également inhibée par le TGF- β qui réduit l'expression de NKp30 à la surface des cellules NK (Castriconi, R. et al. 2003).

Outre la lyse des iDC, les cellules NK sont également capables d'induire la maturation des iDC lors de leurs interactions (Moretta, A. 2005). *In vitro*, les effets des cellules NK sur les iDC sont dépendants du ratio NK/DC. Ainsi, de faibles ratios NK/DC (1/1 à environ 5/1) n'entraînent pas la lyse des iDC mais, leur maturation, alors que des ratios élevés (à partir de 10/1) induisent une lyse importante des iDC (Wilson, J.L. et al. 1999; Piccioli, D. et al. 2002).

Comme pour la lyse des iDC, la capacité des cellules NK à induire la maturation des iDC est dépendante du récepteur NKp30. En effet, après un contact entre une cellule NK et une iDC, l'engagement du récepteur NKp30 provoque la production de TNF- α et d'IFN- γ par les cellules NK, cytokines qui favorisent la maturation de la cellule iDC. Le blocage du récepteur NKp30 par un

anticorps inhibe fortement la maturation des iDC. De plus, des iDC cultivées dans du surnageant issu de la culture de cellules NK stimulées *via* le NKp30 deviennent matures et cet effet est neutralisé avec un anticorps anti-TNF- α (**Figure 54**). De façon similaire à la lyse des cellules iDC par les NK, la maturation des iDC est strictement effectuée par les cellules NK KIR⁺CD94/NKG2A⁺ (Vitale, M. et al. 2005).

Les interactions avec les mDC

Comme nous l'avons vu précédemment, après une interaction entre une mDC et une cellule NK, la mDC sécrète de l'IL-12 qui stimule la production d'IFN- γ et la cytotoxicité de la cellule NK (Trinchieri, G. 2003). Le complexe IL-15/IL-15R α présent à la surface des cellules mDC permet également l'activation des cellules NK *via* une trans-présentation. *In vitro*, l'activation de DC murines avec des ligands des récepteurs « Toll-like » (TLR) induit la formation de complexes pré-assemblés IL-15/IL-15R α à l'intérieur du réticulum endoplasmique. Ces complexes sont ensuite libérés et retrouvés à la surface des DC. Des DC activées de souris déficientes en IL-15 ou IL-15R α n'induisent pas la production d'IFN- γ par les cellules NK de souris sauvages. D'où l'importance des complexes IL-15/IL-15R α à la surface des DC dans l'activation des cellules NK (Mortier, E. et al. 2008). Outre l'activation des cellules NK, ce complexe est également impliqué dans leur survie. En effet, les cellules NK de souris sauvages meurent lorsqu'elles sont transférées dans des souris déficientes en IL-15R α , alors que les cellules NK de souris déficientes en IL-15R α survivent une fois transférées dans des souris sauvages (Koka, R. et al. 2003). Par ailleurs, le blocage d'IL-15R α par un anticorps induit l'apoptose des cellules NK humaines après interaction avec des mDC (Brilot, F. et al. 2007). D'autres études suggèrent également que la *trans*-présentation du complexe IL-15/IL-15R α par les cellules mDC contribue au développement et à la différenciation des cellules NK (Huntington, N.D. et al. 2009; Mortier, E. et al. 2009).

Les interactions avec les pDC

La co-culture de cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC) stimulées, par l'IL-3+CpG ou le virus influenza inactivé, et de cellules NK se traduit par une élévation de la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis de différentes cellules cibles cancéreuses (K562, FO-1...). Cette interaction provoque également l'expression du marqueur d'activation CD69 à la surface des cellules NK. Ces dernières cultivées dans du surnageant de culture de pDC activées présentent les mêmes caractéristiques. Cela suggère que l'activation et l'amplification de la cytotoxicité sont dues à la sécrétion de facteurs solubles par les pDC. De plus, l'expression du CD69 par les cellules NK est fortement réduite en présence d'un anticorps anti-TNF suggérant un rôle important de cette cytokine dans l'activation des cellules NK (Gerosa, F. et al. 2005; Romagnani, C. et al. 2005). La prolifération des cellules NK CD56^{bright} est également stimulée après contact avec des pDC. Cet effet étant fortement inhibé lorsque

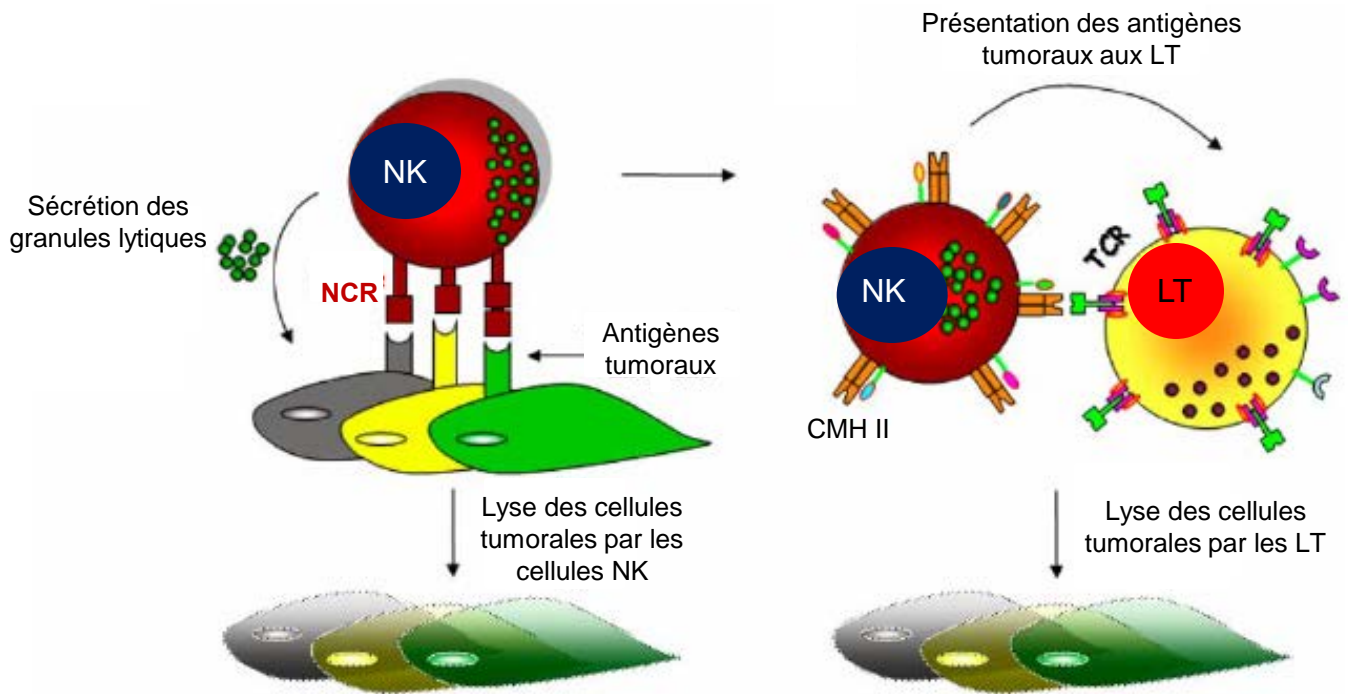


Figure 55 : **Activation des lymphocytes T après contact direct avec les cellules NK**
 (D'après Arnon, T.I. et al. 2006)

les cellules NK et les pDC sont séparées par une membrane semi-perméable ; un contact direct entre les deux types cellulaires est donc nécessaire à la stimulation de la prolifération des cellules NK (Romagnani, C. et al. 2005).

- Les interactions entre les cellules NK et les lymphocytes T

Les interactions avec les lymphocytes effecteurs

Comme nous l'avons vu précédemment (cf paragraphe traitant des cellules NK), les cellules NK peuvent interagir directement avec les LT CD4 et fournir à ces cellules des signaux de co-stimulation nécessaires à leur prolifération et à la production d'IFN- γ (Zingoni, A. et al. 2004). Par ailleurs, les cellules NK peuvent également jouer le rôle de CPA et ainsi directement réguler l'activation des LT. En effet, après activation par des cellules tumorales ou infectées par des virus, les cellules NK sur-expriment les molécules du CMH de classe II et différents ligands co-stimulateurs du TCR (Hanna, J. et al. 2004) (**Figure 55**). L'analyse des cellules NK de tissus inflammés tels que les amygdales confirme qu'en situation pathologique une sur-expression de ces molécules permettant l'activation des LT est également observée *in vivo* (Hanna, J. et al. 2004).

Même si les cellules NK stimulent les LT après un contact direct, elles interagissent essentiellement avec eux *via* la sécrétion de cytokines et les interactions NK/DC. En effet, dans les nœuds lymphatiques, l'IFN- γ sécrété par les cellules NK après interaction avec les mDC conduit à la polarisation de type Th1 des lymphocytes (Martin-Fontecha, A. et al. 2004). De plus, la déplétion des cellules NK, induite *in vivo* par des anticorps, provoque une stimulation lymphocytaire de type Th2 au détriment de la réponse de type Th1 (Coudert, J.D. et al. 2002; Byrne, P. et al. 2004; Martin-Fontecha, A. et al. 2004). Les cellules NK activées, par la présence d'une tumeur ou d'une infection virale, produisent de l'IFN- γ qui à son tour stimule la production d'IL-12 par les DC, aboutissant alors à une réponse T CD8⁺ cytotoxique (Wong, J.L. et al. 2011). Selon les cytokines sécrétées durant la réponse immune innée, les cellules NK peuvent influencer différemment la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs (Agaugue, S. et al. 2008). En effet, après une co-culture en présence de cellules NK activées avec de l'IL-12, les DC misent en culture avec des LT CD4⁺ naïfs se transforment en cellules de type Th1 (Agaugue, S. et al. 2008). En revanche, à la suite d'une co-culture avec des cellules NK activées par de l'IL-18 ou de l'IL-4, les DC sont incapables de polariser les LT CD4⁺ naïfs en lymphocytes de type Th1. Toutefois, la co-culture de cellules NK activées avec de l'IL-18, de DC et de LT CD4⁺ naïfs mène à la polarisation de type Th1 suite à la production d'IL-2 par les LT CD4⁺ naïfs en réponse à l'interaction avec les DC. Cette sécrétion d'IL-2 pourrait contribuer à la production d'IFN- γ par les cellules NK qui induit la polarisation des LT en cellules de type Th1 (Agaugue, S. et al. 2008).

Les interactions avec les lymphocytes T régulateurs (LTreg)

Tous les lymphocytes T ne participent pas à l'immunité anti-tumorale. Une sous population de LT exprimant le CD25 et le facteur de transcription Foxp3, appelée cellules T régulatrices (Treg), joue un rôle important dans l'auto-immunité en inhibant la réponse immunitaire (Takahashi, T. and Sakaguchi, S. 2003). De plus, en situation de cancer ces cellules participent à l'échappement tumoral en empêchant l'action des cellules immunes anti-tumorales dont les cellules NK (Curiel, T.J. et al. 2004; Ghiringhelli, F. et al. 2006). Des cellules NK humaines co-cultivées avec des Treg et des monocytes pré-incubés avec le vaccin de la grippe afin de mimer la stimulation par les CPA *in vivo*, ont une activité lytique inhibée (Trzonkowski, P. et al. 2004). De même, les cellules NK de patients avec des tumeurs stromales gastro-intestinales mises en culture avec des Treg ont une cytotoxicité diminuée comparativement aux cellules NK co-cultivées avec des LT conventionnels (Ghiringhelli, F. et al. 2005a). Malgré la présence de Treg, la cytotoxicité des cellules NK est restaurée lorsque celles-ci sont activées par de l'IL-2, de l'IL-4, de l'IL-7 ou de l'IL-12. De plus, la production d'IFN- γ par les cellules NK en présence d'IL-2 et d'IL-15 n'est pas inhibée par les LTreg, alors que, les cellules NK stimulées par l'IL-12 ont une sécrétion d'IFN- γ réduite en présence de ces cellules (Ghiringhelli, F. et al. 2005a). *In vivo*, la déplétion de LTreg avec un anticorps anti-CD25 dans des souris inoculées avec des cellules tumorales amplifie le rejet des cellules cancéreuses (Smyth, M.J. et al. 2006; Simon, A.K. et al. 2007). Cet effet est dû aux cellules NK puisqu'une déplétion des cellules NK et des LTreg abolit le rejet des cellules tumorales (Smyth, M.J. et al. 2006). Par ailleurs, la présence de LTreg réduit le nombre de cellules NK recrutées au niveau du site tumoral (Simon, A.K. et al. 2007). Les effets suppressifs des LTreg sur la cytotoxicité des cellules NK sont principalement dus à la sous-expression de NKG2D, médiée par le TGF- β , à la surface des cellules NK (Ghiringhelli, F. et al. 2005a; Smyth, M.J. et al. 2006). En effet, les LTreg expriment à leur surface le TGF- β et l'utilisation d'un anticorps anti-TGF- β restaure l'activité cytotoxique des cellules NK en présence de LTreg (Ghiringhelli, F. et al. 2005a; Smyth, M.J. et al. 2006). Les cellules NK co-cultivées avec des LTreg sous-expriment le récepteur activateur NKG2D et l'ajout d'un anticorps anti-TGF- β maintient une expression normale de NKG2D (Ghiringhelli, F. et al. 2005a). Certaines cellules cibles (K562, GIST882) utilisées dans ces études expriment des ligands de NKG2D. Le blocage de ce récepteur est associé à une moindre cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis de ces cibles suggérant que la sous-expression de NKG2D dans les cellules NK induite par le TGF- β des LTreg serait impliquée dans la réduction de l'activité lytique des cellules NK (Ghiringhelli, F. et al. 2005a). D'autres études suggèrent que l'inhibition de l'activité cytotoxique des cellules NK par les Treg ne serait pas due à un contact direct entre Treg et cellules NK mais, résulterait d'une suppression de la production d'IL-2 par les LT conventionnels (Shimizu, J. et al. 1999; Romagnani, C. et al. 2005).

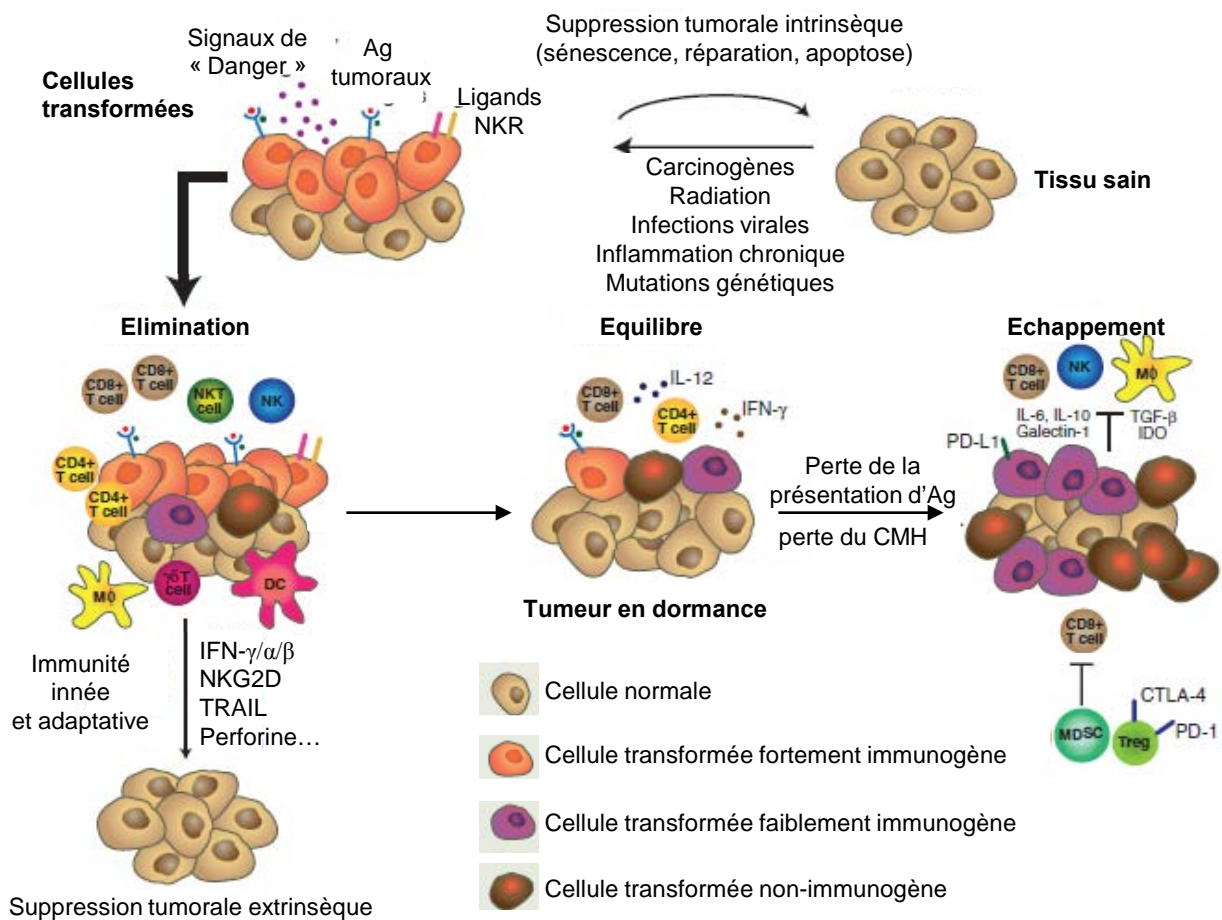


Figure 56 : **Représentation schématique du concept « d'immunoediting » tumoral**

Ag : antigène ; NKR : récepteurs des cellules NK

(D'après Schreiber, R.D. et al. 2011)

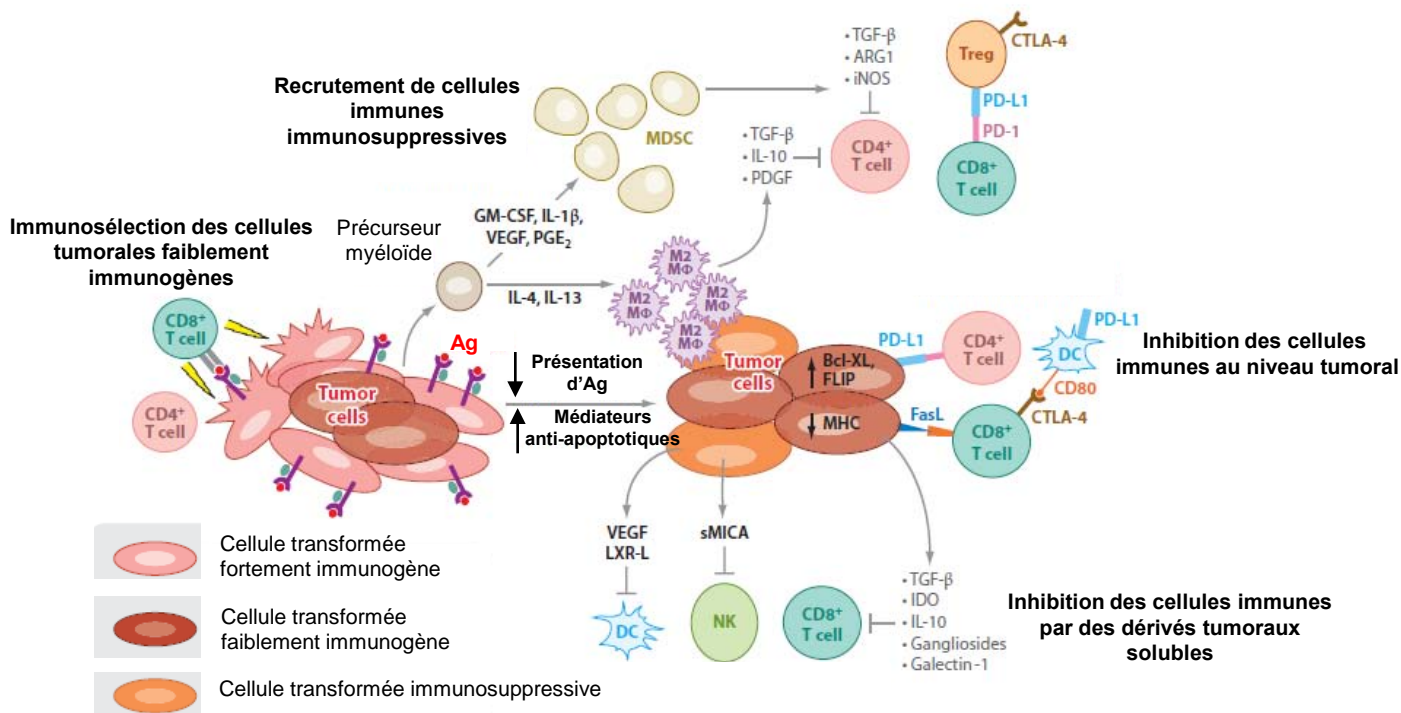


Figure 57 : **Mécanismes tumoraux d'échappement à la réponse immune**

Ag : antigène

(D'après Vesley, M.D. et al. 2011)

II) Les mécanismes d'échappement des tumeurs à l'immunosurveillance

Le système immunitaire exerce trois rôles majeurs dans la prévention des cancers. Tout d'abord, il protège l'hôte des infections virales induisant un cancer par l'élimination de ces virus. Ensuite, il prévient l'établissement d'un environnement inflammatoire qui facilite la cancérogenèse en éliminant les pathogènes et en luttant contre l'inflammation. Enfin, le système immunitaire élimine les cellules néoplasiques dans certains tissus. En effet, les cellules transformées expriment souvent des ligands des récepteurs activateurs des cellules de l'immunité innée mais, aussi des antigènes qui peuvent être reconnus par les récepteurs des lymphocytes de l'immunité adaptative (Schreiber, R.D. et al. 2011; Vesely, M.D. et al. 2011). Toutefois, certaines cellules tumorales échappent à cette immunosurveillance, ce phénomène correspond au concept « d'immunoediting ». Ceci implique une phase de reconnaissance et de stabilisation de la tumeur par des effecteurs immuns, phase durant laquelle les cellules tumorales sont soumises à une pression de sélection par le système immunitaire, et une phase d'échappement où la tumeur est hors de portée du système immunitaire (**Figure 56**) (Schreiber, R.D. et al. 2011; Vesely, M.D. et al. 2011). Afin d'échapper à la vigilance anti-tumorale, les tumeurs ont mis en place différents mécanismes dont certains seront présentés ci-après (**Figure 57**).

II-1 Mécanismes d'échappement tumoral liées à des modifications membranaires des cellules tumorales

II-1-1 Perte ou diminution de l'expression des molécules du CMH de classe I

L'échappement tumoral à la réponse immune peut résulter d'anomalies de la présentation des antigènes par les molécules du CMH de classe I à la surface des cellules tumorales (Garcia-Lora, A. et al. 2003; Aptsiauri, N. et al. 2007). En effet, le processus d'immunosélection associé aux instabilités génétiques inhérentes à toutes les cellules tumorales induit des cellules transformées qui synthétisent peu de molécules du CMH de classe I ou qui ont une voie d'apprêtement des antigènes déficiente (Khong, H.T. and Restifo, N.P. 2002). Plusieurs phénotypes d'altération de l'expression des molécules du CMH de classe I concourent à une perte totale ou partielle de ces molécules à la surface des cellules tumorales (Ruiz-Cabello, F. and Garrido, F. 1998; Seliger, B. et al. 2002). Ces différents phénotypes induisent l'inhibition de la cytotoxicité des LT CD8 sur les cellules tumorales et par conséquent peuvent favoriser l'expansion tumorale (Garcia-Lora, A. et al. 2003; Aptsiauri, N. et al. 2007). Toutefois, la perte totale des molécules du CMH de classe I ne favorise pas nécessairement le développement tumoral car elle augmente l'efficacité des cellules NK en l'absence de signaux inhibiteurs induits par la reconnaissance du CMH de type I (Arpinati, M. et al. 2003; Garcia-Lora, A. et al. 2003; Watson, N.F. et al. 2006). En effet, dans un modèle murin de cancer colorectal, les souris porteuses de tumeurs exprimant le CMH de classe I ont un taux de survie identique à celui des souris

avec des tumeurs n'exprimant pas de molécule du CMH de type I (Watson, N.F. et al. 2006). Ceci suggère un effet cytotoxique des cellules NK sur les deux types de tumeurs. Cependant, les tumeurs avec une expression partielle du CMH de classe I sont associées à un mauvais pronostic en lien avec l'inhibition des cellules T et des cellules NK. En effet, cette expression partielle du CMH de type I non seulement inhibe les cellules NK *via* leurs récepteurs inhibiteurs qui reconnaissent le CMH de classe I mais, n'est pas suffisante pour activer les LT CD8 (Watson, N.F. et al. 2006; Aptsiauri, N. et al. 2007).

II-1-2 Expression tumorale de protéines de la famille du TNF

Comme nous l'avons vu précédemment, les LT CD8 cytotoxiques et les cellules NK expriment Fas-L et TRAIL et l'interaction de ces ligands avec leurs récepteurs de mort (Fas et TRAIL-R) présentés par la cellule cible induit l'apoptose de cette dernière (Smyth, M.J. et al. 2001a; Takeda, K. et al. 2001; Barry, M. and Bleackley, R.C. 2002; Chavez-Galan, L. et al. 2009). Cependant différentes cellules tumorales sont résistantes à ce type d'apoptose. Cela est dû à l'expression par la tumeur de formes mutées inactives des récepteurs de mort Fas et TRAIL-R (Shin, M.S. et al. 2001; Takahashi, H. et al. 2006). La mutation de Fas semble être impliquée dans l'agressivité des cancers métastatiques humains. En effet, chez un patient atteint d'une leucémie, une mutation du gène Fas a été détectée sur les cellules cancéreuses métastatiques et non sur les cancers primaires. De plus, les métastases sont résistantes au traitement avec un anticorps anti-Fas alors que les cellules cancéreuses primaires sont lysées (Maeda, T. et al. 1999).

Certaines cellules tumorales expriment également Fas-L et sont ainsi capables d'induire la mort des lymphocytes T activés présentant le récepteur Fas (Strand, S. et al. 1996; Gastman, B.R. et al. 1999). Les cellules tumorales sont donc capables de contre-attaquer en lysant les LT. Différentes études démontrent que l'expression de Fas-L par les cellules tumorales est associée à une apoptose accrue des LT infiltrés dans la tumeur (Gastman, B.R. et al. 1999; Koyama, S. et al. 2001).

II-1-3 Expression des molécules HLA-G et HLA-E

La molécule HLA-G est exprimée dans différents types de cancers tels que le cancer mammaire, pulmonaire et colique (Fukushima, Y. et al. 1998; Urosevic, M. et al. 2001; Lefebvre, S. et al. 2002). Elle peut se lier aux récepteurs KIR2DL4, ILT-2 et ILT-4 des cellules NK et au récepteur ILT-2 des LT CD8 (Colonna, M. et al. 1998; Navarro, F. et al. 1999; Ponte, M. et al. 1999; Rajagopalan, S. and Long, E.O. 1999). Ainsi, la molécule HLA-G permet aux cellules tumorales d'inhiber les fonctions cytotoxiques des cellules NK et des LT CD8 (Le Gal, F.A. et al. 1999; Riteau, B. et al. 2001).

La molécule HLA-E est exprimée dans différentes lignées cancéreuses dont la plupart sont d'origine hématologique (Marin, R. et al. 2003). Elle est capable de se fixer sur le récepteur inhibiteur

CD94/NKG2A présent à la surface des cellules NK, des LT $\gamma\delta$ et de certains LT CD8, induisant ainsi une inhibition de la lyse des cellules cancéreuses par ces cellules immunitaires effectrices (Le Drian, E. et al. 1998; Derre, L. et al. 2006). En effet, l'utilisation d'un anticorps anti-CD94/NKG2A restaure l'activité cytotoxique des LT CD8 (Speiser, D.E. et al. 1999; Derre, L. et al. 2006).

II-1-4 Réduction ou surexpression des ligands de NKG2D

Comme nous l'avons vu précédemment, le récepteur activateur NKG2D est exprimé par les cellules NK. Il est également présent à la surface des LT CD8, des LT $\gamma\delta$ et des cellules NKT où, comme pour les cellules NK, il reconnaît des ligands exprimés par les cellules stressées tels que MIC A, MIC B, ULBP et H60 (Nausch, N. and Cerwenka, A. 2008).

Différentes stratégies ont été mises en place par les cellules tumorales pour prévenir l'apoptose médiée par le récepteur activateur NKG2D. La plus utilisée est la sous-expression des ligands de NKG2D (Guerra, N. et al. 2008; McGilvray, R.W. et al. 2009). Celle-ci résulterait de la sécrétion de TGF- β par la tumeur ou les cellules du micro-environnement tumoral et de la protéolyse du domaine extracellulaire des ligands de NKG2D par des métalloprotéases ou la disulphide-isomérase ERp5 (Eisele, G. et al. 2006; Kaiser, B.K. et al. 2007). De plus, il a été rapporté que l'IFN- γ et l'IFN- α seraient impliqués dans la réduction de l'expression sur des sarcomes de H60, ligand de NKG2D (Bui, J.D. et al. 2006).

D'autres tumeurs utilisent une stratégie inverse en sur-exprimant les ligands de NKG2D (McGilvray, R.W. et al. 2010). Ce concept est resté relativement mal compris jusqu'à l'utilisation de souris transgéniques exprimant constitutivement les ligands de NKG2D, Rae-1 et MIC A (Oppenheim, D.E. et al. 2005; Wiemann, K. et al. 2005). Chez ces animaux, l'expression de NKG2D à la surface des cellules NK et des LT CD8 est fortement réduite d'où une moindre réponse anti-tumorale (Oppenheim, D.E. et al. 2005; Wiemann, K. et al. 2005). De forts taux plasmatiques de MIC A sont détectés dans ces souris transgéniques (Wiemann, K. et al. 2005) et la forme soluble de MIC A provoque non seulement une diminution de l'expression de NKG2D à la surface des LT mais, aussi une réduction de leur activation (Groh, V. et al. 2002). L'expression de NKG2D sur les cellules immunes des souris sauvages n'est pas affectée par la forme soluble de MIC A isolée à partir du sérum de souris transgéniques. Cela suggère que la diminution de NKG2D chez ces animaux pourrait être causée par l'exposition persistante des cellules immunes à MIC A (Oppenheim, D.E. et al. 2005). Une exposition chronique des cellules NK aux ligands de NKG2D réduit non seulement l'expression du récepteur NKG2D mais, également l'expression des protéines adaptatrices DAP10 et DAP12 de NKG2D (Coudert, J.D. et al. 2005). Par conséquent, chez les souris transgéniques MIC A et Rae-1, la diminution de l'expression de NKG2D sur les cellules immunes pourrait être due à une internalisation du récepteur (Oppenheim, D.E. et al. 2005; Wiemann, K. et al. 2005) et à une réduction du taux des

protéines adaptatrices DAP10 et DAP12 (Coudert, J.D. et al. 2005). L'IFN- γ et le TGF- β sécrétés par la tumeur ou les cellules du micro-environnement tumoral contribuent également à l'inhibition de l'expression de NKG2D sur les cellules NK (Castriconi, R. et al. 2003; Zhang, C. et al. 2005; Song, H. et al. 2006).

II-2 L'échappement tumoral lié aux effecteurs immuns

II-2-1 Lymphocytes Treg

En situation physiologique, la principale fonction des LTreg est de limiter l'auto-immunité et l'inflammation (Takahashi, T. and Sakaguchi, S. 2003). Les marqueurs les plus pertinents pour caractériser ces cellules sont le facteur de transcription Fox3p associé à l'expression du CD25 (Fontenot, J.D. et al. 2003). La perte de fonction du gène Fox3 chez les souris et chez l'homme induit une auto-immunité touchant différents organes et la déplétion des LTreg chez les souris aboutit également à une auto-immunité sévère et fatale (Bennett, C.L. et al. 2001; Kim, J.M. et al. 2007). Comme nous l'avons vu précédemment les LTreg sont capables d'inhiber les fonctions des cellules NK mais, ils peuvent également réduire l'activation des LT CD4 et CD8. Dans le micro-environnement tumoral, les LTreg contribuent à l'échappement des cellules cancéreuses au système immunitaire (Somasundaram, R. et al. 2002; Fu, J. et al. 2007). Ils sont capables d'inhiber la réponse immune anti-tumorale non seulement par la sécrétion d'IL-10 et de TGF- β (Somasundaram, R. et al. 2002; Strauss, L. et al. 2007) mais, aussi par la lyse des cellules NK et des LT CD8 *via* la voie perforine/granzymes (Cao, X. et al. 2007). De nombreuses études décrivent un pourcentage élevé de cellules Treg dans le sang ou les infiltrats lymphocytaires chez des patients atteints de différents types de cancer tel que le cancer du sein (Curiel, T.J. et al. 2004; Li, C.H. et al. 2011). De plus, la présence des LTreg est la plupart du temps associée à un mauvais pronostic (Curiel, T.J. et al. 2004). Au niveau du site tumoral, les cellules Treg pourraient être issues des LT CD4 (Walker, M.R. et al. 2003). Cette conversion semble dépendante du micro-environnement tumoral riche en iDC et en cytokines du type TGF- β et IL-10. En effet, la stimulation des LT CD4 par des iDC permet la conversion des LT CD4 en cellules Treg (Kretschmer, K. et al. 2005). De plus, les iDC et les cellules tumorales peuvent sécréter de l'IL-10 et du TGF- β favorisant ainsi la formation des LTreg à partir des LT CD4 (Ghiringhelli, F. et al. 2005b; Kretschmer, K. et al. 2005).

II-2-2 Macrophages associés aux tumeurs

En situation physiologique, les macrophages de phénotype M1 activés par de l'IFN- γ exercent une activité anti-tumorale et causent des dommages aux tissus environnants (Mantovani, A. et al. 2002). Les macrophages associés au tumeur encore appelés « tumor-associated macrophages » (TAM) ont un phénotype M2 et représentent la composante inflammatoire majoritaire du micro-

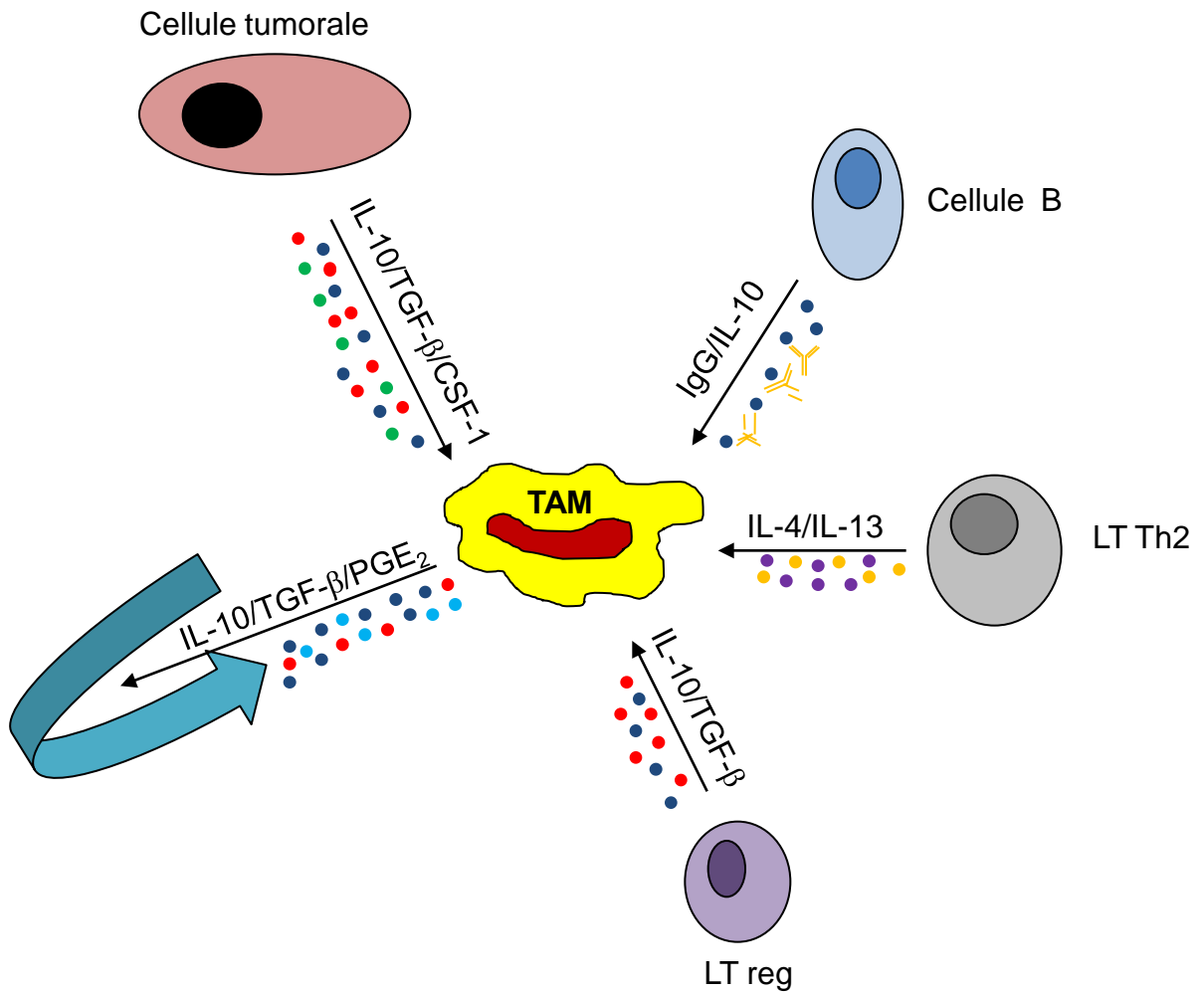


Figure 58 : **Environnement cytokinique induisant la différenciation des macrophages en TAM**
 (D'après Sica, A. 2010)

environnement tumoral (Mantovani, A. et al. 2002). Ils sont impliqués dans le remodelage et la réparation tissulaires, l'immunorégulation et le développement tumoral (Mantovani, A. et al. 2002). Les molécules sécrétées par la tumeur ou les cellules du micro-environnement telles que l'IL-10, le TGF- β et le « colony-stimulating factor 1 » (CSF-1) orientent les macrophages vers le phénotype M2 caractéristique des TAM (Mantovani, A. and Sica, A. 2010; Sica, A. 2010) (**Figure 58**). Le CSF-1 est un facteur de croissance et de différenciation des macrophages et peut être sur-exprimé par les tumeurs du sein, de la prostate, des ovaires et de l'utérus (Kacinski, B.M. 1995; Chambers, S.K. et al. 1997). Chez des souris déficientes pour le CSF-1, il est observé une moindre accumulation des macrophages au niveau de la tumeur, un ralentissement de la progression tumorale et une inhibition des capacités métastatiques des cellules tumorales, illustrant le rôle des TAM dans le développement tumoral (Lin, E.Y. et al. 2001). Des études cliniques ont montré une association étroite entre l'accumulation de TAM et le mauvais pronostic des patients atteints de cancer du sein, de la prostate, du colon et du col de l'utérus (Leek, R.D. et al. 1996; Bingle, L. et al. 2002). Les chimiokines jouent un rôle important dans le recrutement des monocytes au niveau des tissus néoplasiques (Mantovani, A. 1999). La chimiokine CCL2 fréquemment produite par différents types de cellules cancéreuses (Mantovani, A. 1999; Mantovani, A. et al. 2002), attire non seulement les monocytes au niveau du site tumoral mais, stimule également leur survie et leur différenciation en TAM (Leek, R.D. et al. 1996; Roca, H. et al. 2009). Au niveau intra-tumoral, les TAM ont une faible capacité à présenter l'antigène et à produire de l'IL-12 et ils inhibent l'activation et la prolifération des LT par la sécrétion d'IL-10, de TGF- β et de prostaglandine E2 (PGE2) (Sica, A. et al. 2000; Balkwill, F. and Mantovani, A. 2001). Ces macrophages sur-expriment également quelques gènes spécifiques au type M2 tel que l'arginase I (Biswas, S.K. et al. 2006). L'effet de cette enzyme sur le développement tumoral sera détaillé ultérieurement. La migration des macrophages est réduite dans les conditions d'hypoxie (Grimshaw, M.J. and Balkwill, F.R. 2001), et les TAM ne sont pas mobilisés dans les zones tumorales non vascularisées (Leek, R.D. et al. 1996; Leek, R.D. et al. 1999). Cependant, ils favorisent la croissance des vaisseaux sanguins et de ce fait participent au développement tumoral en exprimant les facteurs de transcription « hypoxia-inducible factor-2 α » (HIF-2 α) et HIF-1 qui stimulent la production de facteurs pro-angiogéniques comme le VEGF (Lewis, J.S. et al. 2000; Talks, K.L. et al. 2000; Balkwill, F. and Mantovani, A. 2001). Les TAM contribuent également à la progression et à l'angiogenèse tumorale en produisant la « matrix métalloprotéinase 9 » (MMP-9). En effet, les TAM sont la source majeure de MMP-9 dans les cancers invasifs du sein (Davies, B. et al. 1993a), de la vessie (Davies, B. et al. 1993b) et des ovaires (Naylor, M.S. et al. 1994). De plus, une inhibition de la prolifération tumorale et de l'angiogenèse est observée chez les souris déficientes pour la MMP-9 (Huang, S. et al. 2002).

II-2-3 Les cellules dendritiques

Comme nous l'avons vu précédemment les DC jouent un rôle central dans l'initiation et la régulation de la réponse immune anti-tumorale (Banchereau, J. and Steinman, R.M. 1998; Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. 2001). En condition physiologique, les iDC présentent constamment des antigènes du Soi, provenant des cellules apoptotiques, aux LT potentiellement auto-réactifs. Ceci provoque une anergie ou une déplétion des LT (Steinman, R.M. et al. 2003). De plus, les iDC sont également impliquées dans la différenciation des LTreg qui participent à la tolérance périphérique (Hubert, P. et al. 2007). En absence de signaux de danger, ces mécanismes sont essentiels pour prévenir l'auto-immunité. En revanche, en situation de cancer les DC peuvent contribuer à la formation d'un micro-environnement tumoral favorisant l'échappement des tumeurs (Janikashvili, N. et al. 2011). Un déclin des fonctions des DC, telles que l'absence d'expression de molécules co-stimulatrices, l'inhibition de la production de cytokines pro-inflammatoires, la déficience dans l'apprêtement et la présentation de l'antigène et l'incapacité à activer les LT, est retrouvé chez les patients porteurs d'un cancer (Chaux, P. et al. 1997; Monti, P. et al. 2004).

De plus, différentes molécules sécrétées par la tumeur ou les cellules du micro-environnement altèrent la différenciation et la maturation des DC et de ce fait, induisent l'accumulation d'iDC au niveau de la tumeur (on parle alors de « tumor immature dendritic cells » (TiDC)) et des nœuds lymphatiques (Gabrilovich, D.I. et al. 1996; Janikashvili, N. et al. 2011). Ces TiDC sont incapables d'initier une réponse immune anti-tumorale mais, peuvent induire une anergie des LT (Gabrilovich, D.I. et al. 1996; Steinman, R.M. et al. 2003; Fricke, I. and Gabrilovich, D.I. 2006) et contribuer au recrutement, à l'expansion et à l'activité des LTreg (Hubert, P. et al. 2007; Maldonado, R.A. and von Andrian, U.H. 2010). Par exemple, les TiDC isolées de patientes atteintes de cancer du sein sécrètent de l'IL-13 et expriment des arginases et de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) capables d'inhiber l'activité des LT (Munn, D.H. et al. 2002; Norian, L.A. et al. 2009). Dans des modèles cancéreux murins des iDC, retrouvées au niveau des nœuds lymphatiques, produisent de l'IL-10 et du TGF- β et expriment l'IDO favorisant ainsi un environnement immunosuppresseur (Stoitzner, P. et al. 2008).

Des pDC sont également localisées dans les nœuds lymphatiques de souris implantées avec des cellules cancéreuses B16 (mélanome murin) (Sharma, M.D. et al. 2007) et dans les tumeurs humaines de la tête et du cou (Hartmann, E. et al. 2003). Ces pDC sont recrutées au niveau du micro-environnement tumoral en réponse à certaines chimiokines telle que CCL20 (Zou, W. et al. 2001; Charles, J. et al. 2010). La majorité des pDC expriment l'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) et induisent le recrutement des LTreg, ce qui suggère leur participation dans l'échappement tumoral (Munn, D.H. and Mellor, A.L. 2007).

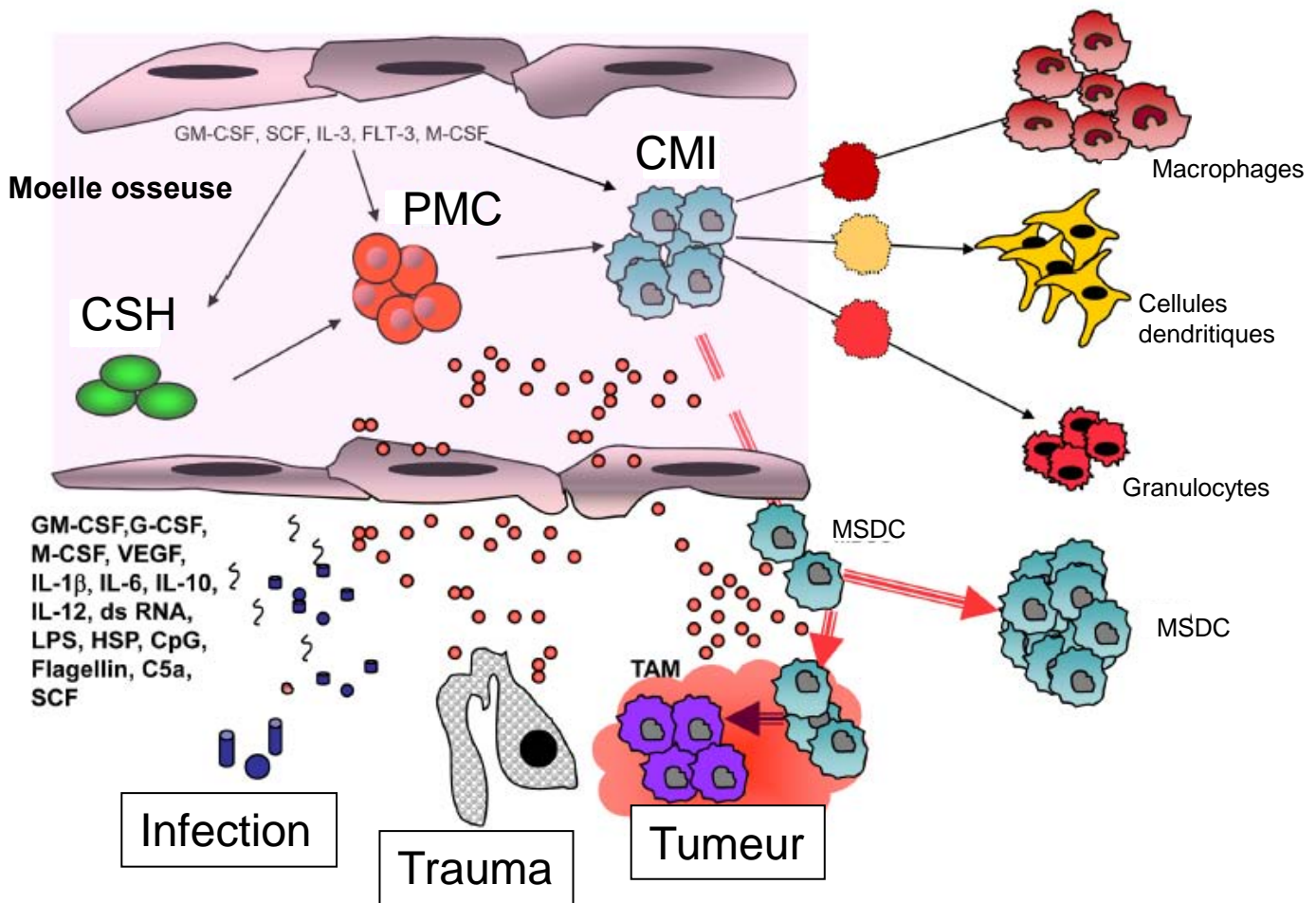


Figure 59 : **Différenciation et migration des MSDC**

CMI : cellules myéloïdes immatures ; CSH : cellules souches hématopoïétiques ; PMC : progéniteurs myéloïdes communs

(D'après Gabrilovich, D.I. and Nagaraj, S. 2009)

II-2-4 Les cellules suppresses dérivées des myéloïdes

Les cellules suppresses dérivées des myéloïdes ou les « myeloid-derived suppressor cells » (MSDC) constituent une population hétérogène de cellules issues de progéniteurs myéloïdes et de cellules myéloïdes immatures. En situation physiologique, les cellules myéloïdes immatures se différencient en granulocytes, en macrophages et en DC. En revanche, en situation pathologique, comme le cancer, les infections ou le trauma, une partie des cellules myéloïdes immatures est activée et se différencie en MSDC (Gabrilovich, D.I. and Nagaraj, S. 2009) (**Figure 59**). Les MSDC murines sont caractérisées par la co-expression des marqueurs de surfaces Gr-1 et CD11b (Gabrilovich, D.I. and Nagaraj, S. 2009) alors que les MSDC humaines présentent le phénotype CD14⁻CD11b⁺ (Zea, A.H. et al. 2005). Des études cliniques ont montré qu'un nombre élevé de MSDC aux niveaux circulant et/ou tumoral est associé à l'inhibition des fonctions des lymphocytes T (Young, M.R. et al. 1997; Serafini, P. et al. 2006; Filipazzi, P. et al. 2007).

L'expansion des MSDC est influencée par différents facteurs produits par la tumeur ou les cellules du micro-environnement tumoral. Parmi eux, il y a la cyclo-oxygénase 2 (COX2), la PGE2 (Serafini, P. et al. 2006; Sinha, P. et al. 2007), l'IL-6 (Bunt, S.K. et al. 2007), le GM-CSF (Serafini, P. et al. 2004) et le VEGF (Gabrilovich, D. et al. 1998). Toutefois, une activation préalable des MDSC est nécessaire pour qu'elles inhibent la réponse immunitaire anti-tumorale. Les cellules transformées et les cellules environnantes sécrètent également de l'IFN- γ , de l'IL-4, de l'IL-13 et du TGF- β qui stimulent les MDSC (Gabrilovich, D.I. and Nagaraj, S. 2009). Ainsi activées, les MDSC réduisent la réponse anti-tumorale *via* leur sécrétion de TGF- β (Terabe, M. et al. 2003), l'expression de l'oxyde nitrique synthase inducible (« inductible nitric oxide synthase », iNOS) et de l'arginase 1 (Kusmartsev, S. et al. 2005; Gallina, G. et al. 2006) et la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Sauer, H. et al. 2001). Les effets de l'iNOS, de l'arginase I et du TGF- β sur les cellules immunitaires seront détaillés ultérieurement. En ce qui concerne les ROS, l'inhibition de leur production par des MDSC isolées à partir de modèles murins cancéreux ou de patients atteints de cancer abolit complètement leur effet immunosuppresseur (Schmielau, J. and Finn, O.J. 2001; Kusmartsev, S. et al. 2004). Les MDSC peuvent également inhiber les cellules NK suite à un contact direct. En effet, des MDSC spléniques, prélevées chez des souris implantées avec des cellules tumorales (YAC-1 ou TS/A), co-cultivées avec des cellules NK murines inhibent la cytotoxicité de ces dernières. Cet effet est aboli lorsque les deux types cellulaires sont séparés par une membrane semi-perméable. Cette inhibition résulte en partie d'une réduction de l'expression de perforine dans les cellules NK (Liu, C. et al. 2007). Des MDSC isolées de patients atteints de carcinome hépatocellulaire, après un contact direct avec le récepteur NKp30 des cellules NK, inhibent non seulement la cytotoxicité mais, également la production d'IFN- γ de ces cellules (Hoechst, B. et al. 2009). La

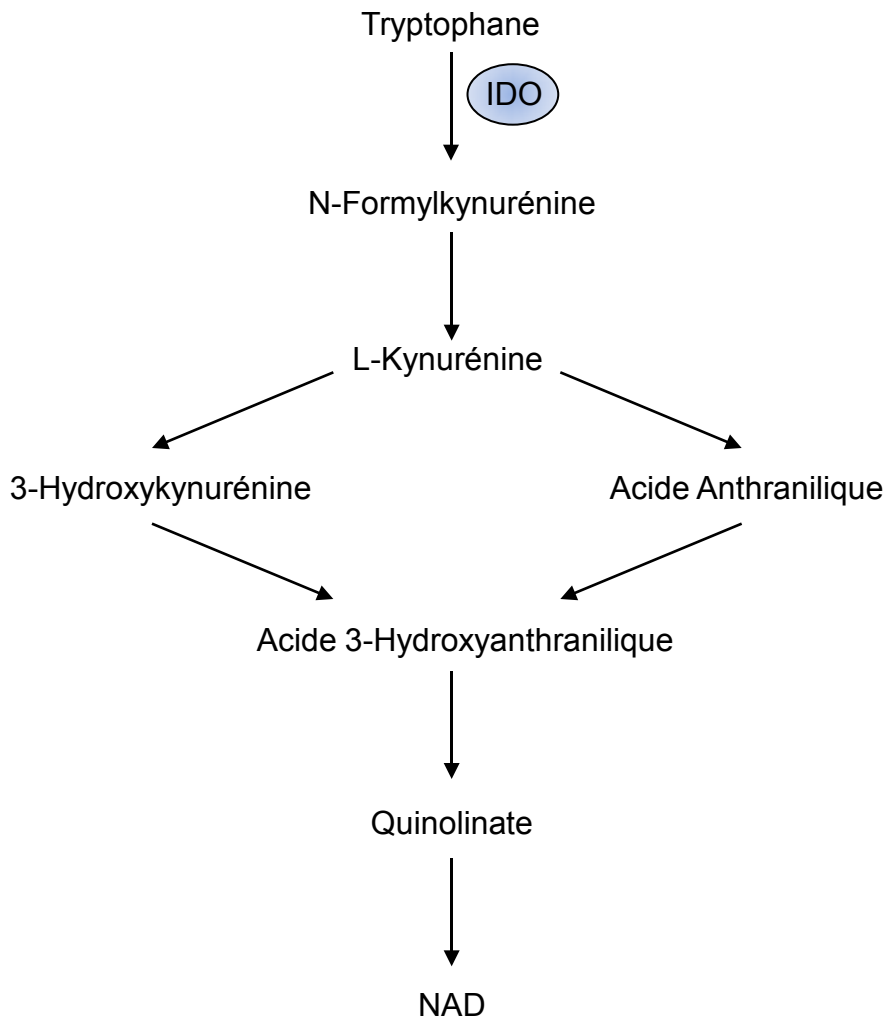


Figure 60 : **Catabolisme du tryptophane dépendant de l'IDO**

IDO : indoléamine 2,3-dioxygénase ; NAD : nicotinamide adénine dinucléotide

(D'après Fallarino, F. et al. 2002)

contribution des MDSC à l'échappement tumoral passe également par l'induction de l'expansion des cellules Treg (Yang, R. et al. 2006).

II-3 Les mécanismes d'échappement tumoral modulés par des facteurs micro-environnementaux

II-3-1 L'indoléamine 2,3-dioxygénase

L'indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) dont l'activité est stimulée par les cytokines pro-inflammatoires catalyse la dégradation du tryptophane. Cette réaction constitue la première étape limitante de la voie des kynurénines et aboutit à la déplétion locale en tryptophane et à la production de métabolites immunomodulateurs (Fallarino, F. et al. 2002; Munn, D.H. and Mellor, A.L. 2007; Liu, X.Q. and Wang, X. 2009) (**Figure 60**). L'IDO est impliquée dans des mécanismes physiologiques endogènes de tolérance périphérique et d'immunosuppression comme le maintien de la tolérance maternelle envers le fœtus durant la grossesse (Munn, D.H. et al. 1998), la régulation des maladies auto-immunes (Kwidzinski, E. et al. 2005) et l'induction de la tolérance des allogreffes (Grohmann, U. et al. 2002). Toutefois, en situation de cancer, l'IDO est capable d'inhiber l'activité anti-tumorale des LT (Viola, A. and Bronte, V. 2007). Des cellules exprimant l'IDO sont retrouvées dans les ganglions lymphatiques de modèles murins cancéreux et de patients atteints de mélanome ou de carcinomes mammaire, pulmonaire ou colique (Lee, J.H. et al. 2005; von Bergwelt-Baildon, M.S. et al. 2006; Munn, D.H. and Mellor, A.L. 2007). La présence de ces cellules dans les nœuds lymphatiques est associée à un mauvais pronostic (Lee, J.H. et al. 2005). Chez l'homme, les cellules exprimant l'IDO ne sont pas définitivement caractérisées mais, il s'agirait de cellules de l'hôte qui ont une morphologie de type plasmocytoïde et non des métastases (Lee, J.R. et al. 2003). Chez la souris, les cellules des ganglions lymphatiques exprimant l'IDO sont phénotypiquement similaires aux pDC murines mais, elles expriment en plus le CD19, un marqueur de surface des cellules B (Munn, D.H. et al. 2004). De plus, *in vitro*, les DC des nœuds lymphatiques exprimant l'IDO inhibent la réponse des LT et induisent une anergie des LT spécifiques de l'antigène lorsqu'elles sont transférées dans un nouvel hôte. Cela suggère que les DC des ganglions lymphatiques participent à l'inhibition de l'initiation de la réponse immune envers les antigènes dérivés de la tumeur et pourraient induire une tolérance systémique vis-à-vis de ces derniers (Munn, D.H. et al. 2005). Diverses tumeurs humaines expriment également l'IDO (Uyttenhove, C. et al. 2003) et cette expression est associée à un mauvais pronostic notamment dans les cancers des ovaires (Okamoto, A. et al. 2005), de l'endomètre (Ino, K. et al. 2006) et du colon (Brandacher, G. et al. 2006). Il n'est pas encore déterminé si ce mauvais pronostic est dû à l'effet immunosuppresseur de l'IDO ou à une altération générale de la biologie de la tumeur (Munn, D.H. and Mellor, A.L. 2007; Liu, X.Q. and Wang, X. 2009). L'étude de modèles murins permet de spéculer que l'expression de l'IDO par la tumeur pourrait induire une immunosuppression locale. En effet, les

cellules murines tumorales transfectées avec l'IDO deviennent résistantes à la réponse immune anti-tumorale (Uyttenhove, C. et al. 2003). Cette résistance est également observée chez des souris pré-immunisées pour ces tumeurs ou ayant éliminées ces mêmes cellules tumorales n'exprimant pas l'IDO (Uyttenhove, C. et al. 2003). L'expression constitutive de l'IDO par les cellules tumorales pourrait être la conséquence des instabilités génétiques inhérentes aux cellules cancéreuses (Muller, A.J. et al. 2005). Cette expression peut également être induite par l'IFN- γ et d'autres médiateurs inflammatoires (Taylor, M.W. and Feng, G.S. 1991). Par conséquent, l'IDO pourrait être induite secondairement dans les cellules tumorales ou dans le micro-environnement tumoral en réponse à des cytokines inflammatoires sécrétées au cours de la réponse immune anti-tumorale précoce de l'hôte (Dunn, G.P. et al. 2006).

La dégradation du tryptophane par l'IDO induit des métabolites tels que le N-formylkynurénine et le L-kynurénine capables d'inhiber la prolifération ou d'induire l'apoptose des LT (Fallarino, F. et al. 2002; Frumento, G. et al. 2002) et des cellules NK (Frumento, G. et al. 2002; Della Chiesa, M. et al. 2006). Certains de ces métabolites peuvent également provoquer la différenciation des LT CD4 en LTreg (Chen, W. et al. 2008). Les mécanismes moléculaires par lesquels ils exercent leurs effets immunosuppresseurs ne sont pas connus. Cependant, une étude montre que l'apoptose des LT, induite par les produits de dégradation du tryptophane, passe par l'activation de la caspase 8 et le relargage mitochondrial du cytochrome *c* (Fallarino, F. et al. 2002). De plus, le récepteur « G protein-coupled 35 » (GPR35) est capable de lier les métabolites du tryptophane ; bien que son rôle ne soit pas défini, il est exprimé par de nombreuses cellules immunitaires et par certaines cellules intestinales qui renferment l'IDO (Wang, J. et al. 2006).

Outre les effets immunosuppresseurs des métabolites du tryptophane, le stress cellulaire, en réponse à une déplétion locale en tryptophane par l'IDO, est également impliqué dans l'inhibition de la réponse immune anti-tumorale (Munn, D.H. and Mellor, A.L. 2007; Lob, S. et al. 2009). La déplétion en tryptophane se traduit pour les LT par une diminution de la prolifération, une anergie (Munn, D.H. et al. 2005) et une susceptibilité accrue à l'apoptose (Lee, G.K. et al. 2002). Cependant, la prolifération et la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK ne sont pas modulées par l'absence de tryptophane (Oberlies, J. et al. 2009). Au sein des cellules T, la teneur réduite en tryptophane provoque une accumulation des ARNt non chargés responsable de l'activation de la protéine kinase « general control non derepressible 2 » (GCN2) (Munn, D.H. et al. 2005; Fallarino, F. et al. 2006). Cette protéine est le premier acteur d'une voie de signalisation qui aboutit soit à la répression de la traduction de nombreuses protéines dont la chaîne CD3 ζ du TCR soit à la sur-expression de quelques gènes (Fallarino, F. et al. 2006; Wek, R.C. et al. 2006). Les gènes sur-exprimés diffèrent d'un type cellulaire à l'autre. La façon dont cette voie de signalisation module la réponse immune n'est pas entièrement élucidée (Munn, D.H. and Mellor, A.L. 2007). Cependant, les LT issus de souris

déficientes en GCN2 sont résistants à la déplétion en tryptophane induite par l'IDO (Munn, D.H. et al. 2005). La concentration de cet acide aminé doit être inférieure à 0,5 μM pour provoquer, *in vitro*, une réduction de la prolifération des LT (Munn, D.H. et al. 1999). A l'inverse, une autre étude n'observe pas de diminution de la prolifération des LT en absence totale de tryptophane (Frumento, G. et al. 2002). *In vitro*, si le tryptophane peut être totalement dégradé par les cellules exprimant l'IDO, il reste encore à démontrer si une telle déplétion est possible voire souhaitable *in vivo*. Le taux plasmatique de tryptophane chez l'homme varie entre 50 et 100 μM ; des déplétions locales peuvent être rapidement comblées par le tryptophane provenant des tissus environnants par simple diffusion (Lob, S. et al. 2009). Ainsi, la déplétion locale en tryptophane serait donc un phénomène immunosuppresseur de courte portée car le pool de tryptophane d'un individu ne peut être totalement déplété. Les LT établissent des contacts étroits avec les CPA qui expriment l'IDO, ainsi il se pourrait que lors de ces interactions la concentration de tryptophane soit assez faible pour activer la voie de signalisation GCN2 au sein des LT (Munn, D.H. and Mellor, A.L. 2007).

II-3-2 Le TGF- β

Dans les cellules normales, le facteur de croissance transformant β ou « transforming growth factor- β (TGF- β) » *via* la voie de signalisation Smad bloque le cycle cellulaire en phase G1 et stoppe la prolifération, la différenciation et induit l'apoptose (Calone, I. and Souchelnytskyi, S. 2012). Cependant, au cours du développement tumoral les cellules cancéreuses deviennent résistantes à l'inhibition de la prolifération par le TGF- β tout en continuant à le sécréter, contribuant ainsi à la formation d'un micro-environnement tumoral immunosuppresseur (Yang, L. et al. 2010). L'implication du TGF- β dans l'échappement tumoral a été démontrée dans des études portant sur la délétion du gène TGF β R2 codant pour le récepteur du TGF- β de type II dans des cellules épithéliales dont les cellules cancéreuses mammaires, pancréatiques, intestinales et coliques. Cette délétion stimule le développement tumoral et métastatique (Yang, L. and Moses, H.L. 2008). En effet, dans les cellules de carcinomes mammaires, la délétion du gène TGF β R2 induit la sécrétion de chimiokines permettant le recrutement, au niveau du micro-environnement tumoral, des MDSC (Yang, L. et al. 2008). La production de TGF- β et de MMP par ces MDSC est un des mécanismes majeur dans la progression tumorale et métastatique (Yang, L. et al. 2008; Yang, L. and Moses, H.L. 2008). De plus, une forte production de TGF- β , observée dans les gliomes agressifs fortement prolifératifs, est associée à un mauvais pronostic (Bruna, A. et al. 2007). Chez la souris, la stimulation de la voie de signalisation Smad par l'expression constitutive du TGF- β ou de son récepteur dans les cellules épithéliales mammaires, augmente le nombre de métastases pulmonaires alors que l'inhibition systémique de cette voie de signalisation le diminue (Arteaga, C.L. 2006).

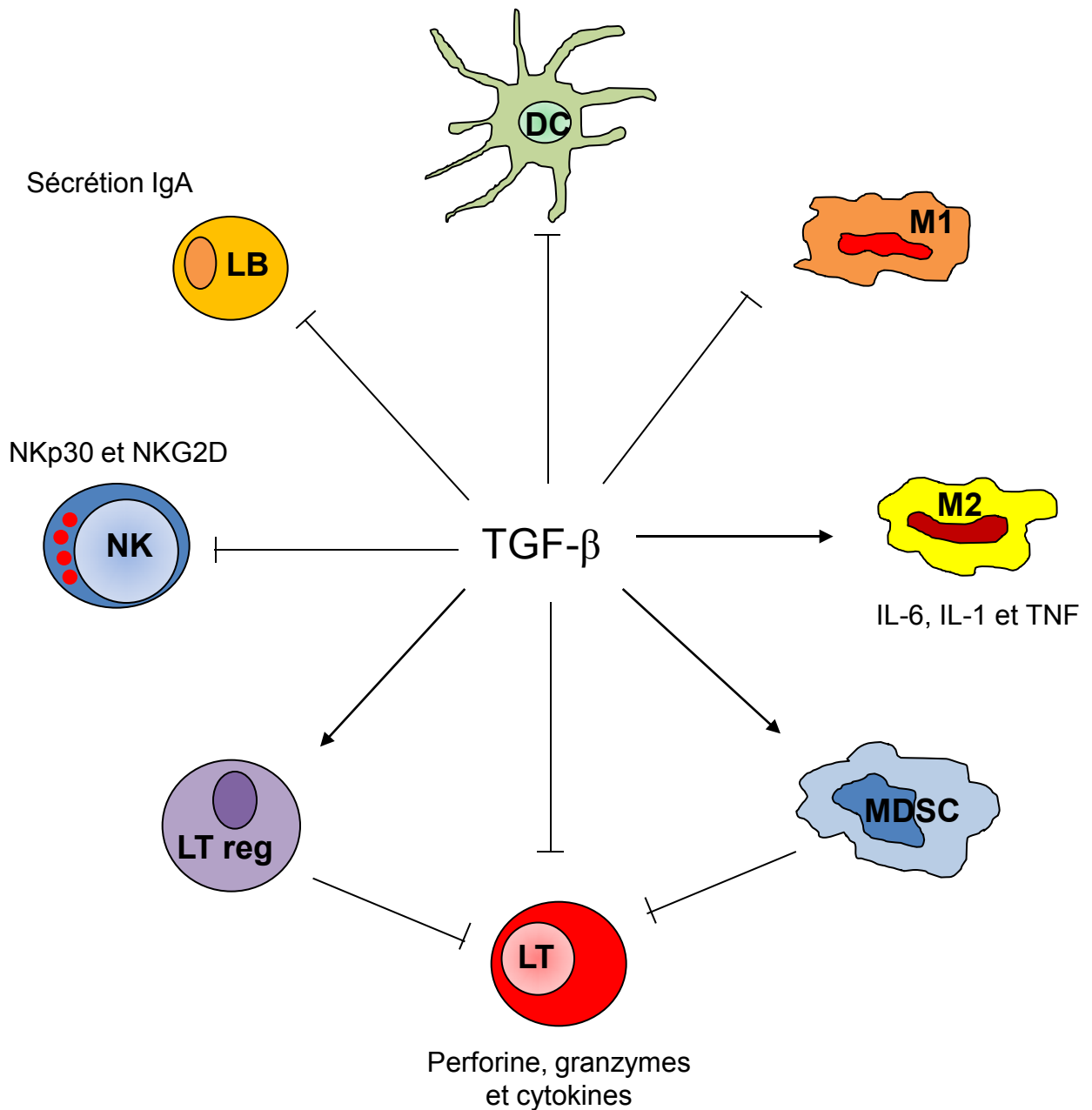


Figure 61 : **Régulation des cellules immunes par le TGF-β du micro-environnement tumoral**
 DC : cellule dendritique ; Ig : immunoglobuline ; IL : interleukine ; LB : lymphocyte B ; LT : lymphocyte T ; LT reg : lymphocyte T régulateur ; M1 : macrophage de phénotype M1 ; M2 : macrophage de phénotype M2 ; MDSC: cellule suppresseur dérivée des myéloïdes ; NK : cellule natural killer ; TNF : tumor necrosis factor
 (D'après Yang, L. et al. 2010)

Le TGF- β participe également à l'échappement tumoral par une dérégulation des cyclines kinases inhibitrices, une augmentation de l'expression de protéases et de MMP, une stimulation de l'angiogenèse et une diminution de la réponse immunitaire anti-tumorale (Massague, J. 2008). En effet, comme nous l'avons vu précédemment, le TGF- β produit par les LTreg est capable d'inhiber la cytotoxicité des cellules NK *via* la réduction de l'expression des récepteurs activateurs NKp30 et NKG2D (Ghiringhelli, F. et al. 2005a; Wilson, E.B. et al. 2011). De plus, il diminue également l'activité des autres cellules immunes anti-tumorales (Li, M.O. et al. 2006). En effet, il réduit la cytotoxicité des LT CD8 par une répression transcriptionnelle des gènes codant pour les protéines effectrices de l'activité cytotoxique telles que la perforine et les granzymes (Thomas, D.A. and Massague, J. 2005). De plus, des souris transgéniques avec un allèle dominant négatif du gène TGF β R2 sous contrôle d'un promoteur spécifique aux cellules T, possédant par conséquent des LT insensibles au TGF- β , sont capables d'éliminer les cellules tumorales de mélanomes (B16) contrairement aux souris sauvages. Cela suggère que le TGF- β inhibe l'activité anti-tumorale des LT (Gorelik, L. and Flavell, R.A. 2001). Il provoque également la différenciation des LT CD4 en LTreg acteurs de l'échappement tumoral (Shevach, E.M. 2009). Le TGF- β peut également inhiber la sécrétion d'Ig par les LB ainsi que leur prolifération (Cazac, B.B. and Roes, J. 2000). Chez des souris avec une délétion du TGF β R2 spécifique aux cellules B, une expansion significative des LB est observée, suggérant que le TGF- β inhibe leur prolifération (Cazac, B.B. and Roes, J. 2000). De plus, le TGF- β inhibe la sécrétion des IgA par les LB puisque ces souris ne présentent pas d'IgA dans leur sérum (Cazac, B.B. and Roes, J. 2000). Les effets du TGF- β sur les cellules immunes est résumé dans la **Figure 61**.

II-3-3 Le VEGF

Le « vascular endothelial growth factor » (VEGF) est sécrété par de nombreuses cellules tumorales et sa production est associée à un mauvais pronostic (Toi, M. et al. 1996). Il stimule la prolifération des cellules endothéliales et joue un rôle dans la néo-vascularisation tumorale (Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. 1997). Le VEGF participe à l'échappement tumoral en inhibant l'activité des DC. En effet, *in vitro*, le blocage du VEGF par un anticorps neutralise l'effet négatif du surnageant de cellules tumorales sur la maturation de DC (Gabrilovich, D.I. et al. 1996). De plus, il a été rapporté une corrélation négative entre la densité de DC et l'expression du VEGF dans la tumeur (Saito, H. et al. 1998) et au niveau systémique chez des patients cancéreux (Lissoni, P. et al. 2001). Le taux circulant de VEGF chez ces patients est également associé à une expansion des MDSC et une inhibition de la maturation des DC (Gabrilovich, D. et al. 1998; Melani, C. et al. 2003). Enfin, l'administration chronique de VEGF à des souris induit une altération du développement des DC et un accroissement de la production des MDSC (Oyama, T. et al. 1998).

II-3-4 L'IL-10

L'IL-10, sécrétée majoritairement par les LT et les LT $\gamma\delta$, est une cytokine immunomodulatrice capable d'induire des effets antagonistes soit immuno-stimulants soit immuno-suppressifs (Pestka, S. et al. 2004). En effet, l'IL-10 potentialise la réponse des LT CD8 stimulés par l'IL-2 et l'IL-4 et inhibe leur apoptose (Cohen, S.B. et al. 1997). Cette cytokine peut également favoriser l'apoptose et réduire l'angiogenèse durant le développement tumoral (Kundu, N. and Fulton, A.M. 1997; Blankenstein, T. 2005). L'expression d'IL-10 dans les xénogreffes de carcinomes mammaire et ovarien inhibe la prolifération et la propagation tumorale (Kundu, N. and Fulton, A.M. 1997; Kohno, T. et al. 2003). Cet effet est en partie dû à une moindre expression du CMH de classe I qui favorise l'activation des cellules NK alors capables de lyser les cellules cancéreuses (Kundu, N. and Fulton, A.M. 1997). L'IL-10 participe également à l'immunité anti-tumorale en inhibant la production de VEGF, de TNF- α et d'IL-6 par les TAM (Huang, S. et al. 1999).

A l'inverse, l'IL-10 contribue également à l'échappement tumoral par son effet immuno-suppressif. Cela pourrait dépendre des interactions avec d'autres cytokines ou avec des facteurs du micro-environnement tumoral ainsi que de la présence de LTreg (Zamarron, B.F. and Chen, W. 2011). De nombreuses cellules tumorales sécrètent de l'IL-10 et sa présence est quantifiable dans le sérum de patients cancéreux (Moore, K.W. et al. 2001). Le rôle autocrine et/ou paracrine de l'IL-10 module la prolifération et la survie des cellules tumorales (Sredni, B. et al. 2004). La fixation de l'IL-10 sur son récepteur induit l'activation de STAT3 provoquant la sur-expression de gènes anti-apoptotiques tel que Bcl-2 (Alas, S. et al. 2001; Sredni, B. et al. 2004).

Outre ses effets sur la prolifération et la survie des cellules tumorales, l'IL-10 peut également inhiber la réponse immune anti-tumorale (Mocellin, S. et al. 2005). Cette cytokine inhibe, *in vitro*, la sécrétion d'IL-2 et la prolifération des LT CD4 humains (de Waal Malefyt, R. et al. 1993). Des DC incubées en présence d'IL-10 sont incapables de présenter les antigènes de mélanome aux LT CD8, d'où l'anergie de ces cellules envers les cellules tumorales (Steinbrink, K. et al. 1999). De plus, l'IL-10, sécrétée par les LT et les LT $\gamma\delta$, inhibe la production d'IFN- γ par les cellules NK et NKT provoquant une réduction de l'activation des LT CD8 cytotoxiques et des LT de type Th1 et privilégiant ainsi le développement tumoral (Moore, K.W. et al. 2001). L'expression accrue de la molécule HLA-G par les tumeurs, responsable d'une moindre cytotoxicité des cellules NK et des LT CD8 est également associée à la production d'IL-10 par les cellules cancéreuses (Urosevic, M. and Dummer, R. 2003). Enfin, des monocytes isolés d'ascites de patients atteints de cancer ovarien peuvent inhiber la prolifération des LT *via* leur sécrétion d'IL-10 (Loercher, A.E. et al. 1999).

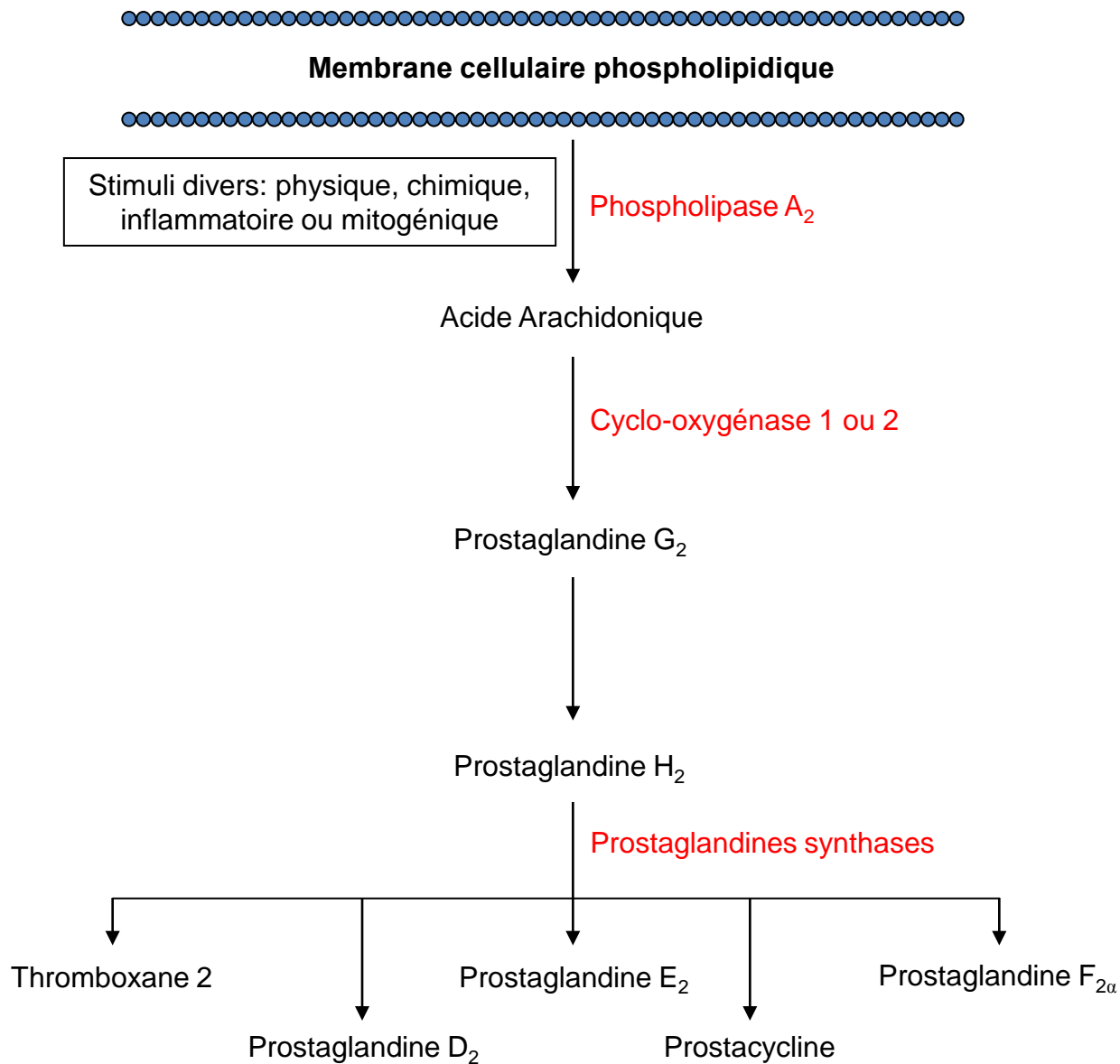


Figure 62 : **Synthèse de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique *via* les cyclo-oxygénases**
(D'après Funk, C.D. 2001)

II-3-5 La cyclo-oxygénase 2

Les cyclo-oxygénases (COX) sont des enzymes qui permettent la synthèse de prostaglandines à partir de l'acide arachidonique (**Figure 62**) (Funk, C.D. 2001). Trois isoformes de COX ont été décrites : COX1, COX2 et COX3 (Funk, C.D. 2001). Cette dernière isoforme est une protéine tronquée, issue de l'épissage alternatif de COX1, sans activité enzymatique (Snipes, J.A. et al. 2005). Chez l'homme, COX1 est exprimée constitutivement dans de nombreux tissus tels que les reins, les poumons et le colon. Elle est responsable du maintien du taux basal de prostanglandines (Williams, C.S. et al. 1999). A l'inverse, COX2 est exprimée spécifiquement dans le système nerveux central (Svensson, C.I. and Yaksh, T.L. 2002), les reins (Adegboyega, P.A. and Ololade, O. 2004) et les vésicules séminales (Kirschenbaum, A. et al. 2000). Elle peut être induite par plusieurs stimuli inflammatoires et mitogéniques (Chen, C.C. et al. 2001; Pereg, D. and Lishner, M. 2005). De nombreux types tumoraux sur-expriment COX2 (Subbaramaiah, K. and Dannenberg, A.J. 2003; Pereg, D. and Lishner, M. 2005). Les cellules non invasives de cancer mammaire (MCF-7) expriment deux fois plus de COX2 que les cellules bénignes de cancer mammaire (MCF-10F) (Thill, M. et al. 2009). La prostaglandine E2 (PGE2), produit de COX2, est retrouvée dans le cancer du poumon, du colon, du sein et de la prostate (Gasparini, G. et al. 2003). La PGE2 exerce son effet après fixation sur des récepteurs de surface « E prostanoïde » (EP)1, EP2, EP3 et EP4 (Harris, S.G. et al. 2002).

COX2 participe à l'échappement tumoral en stimulant le développement et l'angiogenèse des tumeurs. En effet, la sur-expression de COX2 dans des cellules coliques transformées provoque la production de VEGF *via* la translocation de HIF-1 α (Tsuji, M. et al. 1998). Des cellules de cancer du colon humain (Caco-2) transfectées avec COX2 sont davantage invasives de par leur production de MMP-2 (Tsuji, M. et al. 1997). Chez des souris déficientes pour COX2, le développement et la vascularisation des carcinomes pulmonaires de Lewis sont réduits. Les fibroblastes de ces souris ont également une capacité de production du VEGF abaissée de 94% (Williams, C.S. et al. 2000). Des souris sauvages porteuses de tumeurs pulmonaires de Lewis présentent également un ralentissement du développement tumoral lorsque COX2 est neutralisée grâce à un inhibiteur spécifique (Williams, C.S. et al. 2000). Les tumeurs de patients atteints d'adénocarcinome gastrique sur-exprimant COX2 ont un taux élevé de PGE2 et une vascularisation plus importante que les tumeurs ne sur-exprimant pas cette enzyme (Uefuji, K. et al. 2000). De plus, il a été montré que les produits de dégradation de l'acide arachidonique par COX2 tels que le thromboxane A2 et PGE2 sont également capables de stimuler l'angiogenèse tumorale (Daniel, T.O. et al. 1999; Inoue, H. et al. 2002). PGE2 peut réduire l'effet anti-angiogénique des agents inflammatoires non stéroïdiens qui inhibent COX2. Ceci suggère que PGE2 est l'un des médiateurs majeurs de l'effet pro-angiogénique de COX2 (Hernandez, G.L. et al. 2001). Différentes études ont démontré que PGE2 provoque la sur-expression de VEGF au sein des cellules endothéliales (Pai, R. et al. 2001) et des cellules transformées ovariennes (Spinella, F. et al.

2004). Outre son effet pro-angiogénique, COX2 peut aussi inhiber l'apoptose des cellules cancéreuses. Cette résistance à l'apoptose est causée par la sur-expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 par les cellules cancéreuses en réponse au taux élevé de PGE2 (Sheng, H. et al. 1998). L'inhibition de la réponse immune anti-tumorale contribue également à l'échappement tumoral induit par COX2. Dans un modèle murin de carcinome pulmonaire de Lewis, l'inhibition de COX2 ou de PGE2 stimule l'infiltration tumorale par des lymphocytes et diminue la production d'IL-10 et le développement tumoral. Cela suggère que PGE2 participe à l'échappement tumoral en augmentant la production d'IL-10 qui induit des effets immunosuppresseurs (Stolina, M. et al. 2000). PGE2 est également capable d'inhiber la production de cytokines de type Th1 telles que le TNF- α , l'IFN- γ et l'IL-2 (Harris, S.G. et al. 2002) et de provoquer la sécrétion de cytokines de type Th2 comme l'IL-4, l'IL-6 et l'IL-10 douées de propriétés immunosuppressives (Della Bella, S. et al. 1997; Shreedhar, V. et al. 1998). PGE2, sécrétée par la tumeur ou les cellules du micro-environnement tumoral, peut également moduler la réponse immune en inhibant la différenciation des DC, la prolifération des LT et des LB et l'activité anti-tumorale des macrophages et des cellules NK (Pollard, J.W. 2004). Chez des patientes souffrant de cancer du sein, il a été établi une corrélation positive entre l'expression tumorale de COX2 et la perte de fonctions des DC et des LT CD8 (Pockaj, B.A. et al. 2004). COX2 stimule également l'infiltration des LTreg au niveau tumoral ce qui contribue à la mise en place d'un environnement immuno-suppressif (Sharma, A. et al. 2005). Dans des modèles murins de cancer pulmonaire ou mammaire, l'inhibition de COX2 diminue l'expression d'arginase I par les MDSC tumorales induisant ainsi une stimulation de la réponse immune anti-tumorale (Rodriguez, P.C. et al. 2005; Sinha, P. et al. 2007). L'effet de l'arginase I sur les cellules immunes est détaillé ci-dessous.

II-3-6 Les oxydes nitriques synthases et les arginases

Tout comme l'IDO, il existe une relation étroite entre le catabolisme de l'arginine, l'immunité et le développement tumoral. Elle implique aussi bien des effets directs sur la croissance et la survie des cellules cancéreuses que des effets indirects incluant les cellules immunitaires associées aux tumeurs (Bronte, V. and Zanovello, P. 2005; Rodriguez, P.C. and Ochoa, A.C. 2006; 2008).

II-3-6-a Le métabolisme de l'arginine

L'arginine est considérée comme un acide aminé non-essentielle puisque sa synthèse peut être réalisée à partir de la citrulline grâce à une collaboration entre les cellules épithéliales de l'intestin grêle et les tubes proximaux des reins (Brosnan, M.E. and Brosnan, J.T. 2004). Toutefois, cet acide aminé devient conditionnellement essentiel dans des situations patho-physiologiques pour lesquelles sa production est insuffisante pour couvrir l'ensemble des besoins de l'organisme (Nieves, C., Jr. and Langkamp-Henken, B. 2002). Le transport cellulaire de l'arginine est assuré par les transporteurs cationiques des acides aminés (« Cationic Amino-acid Transporters » (CAT)) (Closs, E.I. et al. 2006).

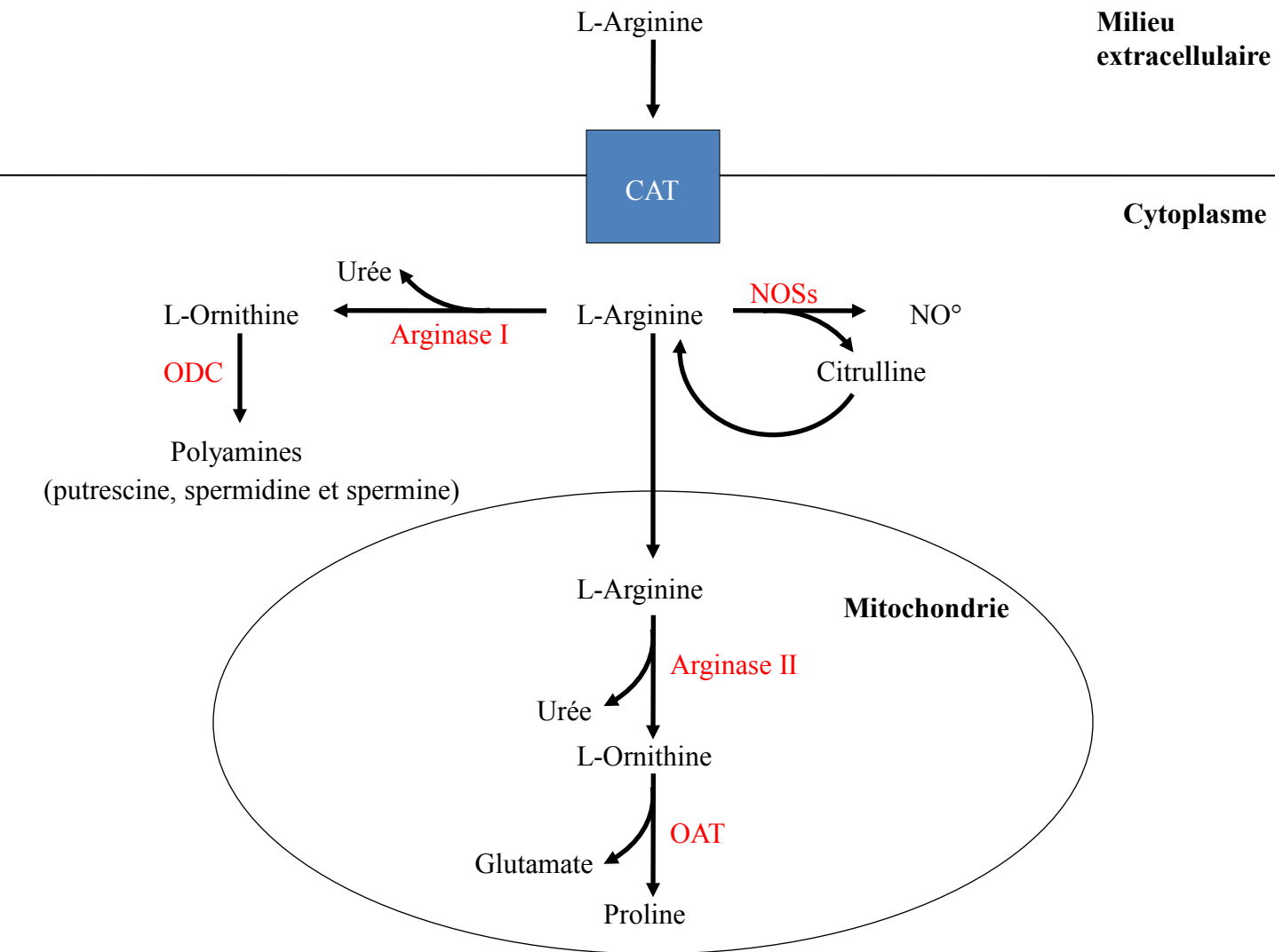


Figure 63 : **Métabolisme cellulaire de l'arginine**

CAT : cationic amino-acid transporteur ; ODC : ornithine décarboxylase ; OAT : ornithine aminotransférase ; NO°: oxyde nitrique ; NOSs : oxyde nitrique synthases

(D'après Li, H. et al. 2001)

A l'intérieur de la cellule, l'arginine peut être métabolisée par deux voies (**Figure 63**). La première voie de dégradation est l'hydrolyse en urée et ornithine sous l'action de l'arginase dont il existe deux isoformes. L'arginase I, enzyme cytosolique colocalisée avec l'ornithine décarboxylase (ODC), dégrade l'ornithine en polyamines essentielles pour la prolifération et la différenciation cellulaire. L'arginase II, colocalisée avec l'ornithine aminotransférase (OAT) au niveau mitochondrial, hydrolyse l'ornithine en proline et glutamate, tous deux indispensables à la synthèse du collagène au sein du tissu conjonctif (Wu, G. and Morris, S.M., Jr. 1998; Li, H. et al. 2001). La seconde voie métabolique engendre la production d'oxyde nitrique (NO°) et de citrulline grâce aux NO synthases (NOSs) dont il existe trois isoformes : la NOS endothéliale (eNOS), la NOS neuronale (nNOS) et la NOS inducible (iNOS). La plupart du temps, eNOS et nNOS sont exprimées constitutivement et sont dépendantes du Ca²⁺ alors que l'iNOS est induite par les cytokines pro-inflammatoires (Suchner, U. et al. 2000). eNOS génère de faibles quantités de NO° alors qu'iNOS en produit de fortes quantités (Norrby, K. 2000). L'arginine peut également être recyclée à partir de la citrulline *via* l'argininosuccinate synthase (ASS) et l'arginosuccinate lyase (ASL) (Morris, S.M., Jr. 2002). L'arginase I et l'iNOS sont différenciellement régulées par les cytokines de type Th1 et Th2 (Hesse, M. et al. 2001). En effet, l'expression de l'arginase I est induite par les cytokines de type Th2 telles que l'IL-4, l'IL-10 et l'IL-13 (Corraliza, I.M. et al. 1995; Louis, C.A. et al. 1999) alors que l'iNOS est induite par les cytokines de type Th1 comme le TNF- α et l'IFN- γ (Bogdan, C. 2001). De plus, l'inhibition de l'arginase I stimule l'expression d'iNOS (Chicoine, L.G. et al. 2004) et à l'inverse, une sur-expression d'arginase I réduit l'activité d'iNOS (Zhang, C. et al. 2004).

II-3-6-b Les NOS dans la réponse anti-tumorale

Le NO° est un des acteurs de la mort des cellules tumorales. La majeure source de NO° provient de l'iNOS des macrophages de type M1 (Wink, D.A. et al. 1998; Klimp, A.H. et al. 2002). En effet, plusieurs études, *in vitro* et *in vivo*, ont montré que les macrophages participent à la vigilance anti-tumorale en lysant divers types de cellules transformées essentiellement *via* leur production de NO° (Di Carlo, E. et al. 2000a; Shi, Q. et al. 2000). Les effets anti-tumoraux du NO° sont engendrés par différents mécanismes tels que des dommages directs à l'ADN, l'inhibition de la synthèse d'ADN, l'activation de la voie p53, l'induction directe de l'apoptose ou de s perturbations mitochondriales. Tous ces mécanismes aboutissant à la mort des cellules tumorales (Brune, B. 2003; Xu, W. et al. 2004). Les LT humains isolés à partir du sang périphérique produisent également du NO° après activation. En effet, suite à l'engagement avec une CPA, l'eNOS est transloquée de l'appareil de Golgi à la synapse immunologique où elle est activée et génère du NO° contribuant à la modulation du signal transmis par la synapse (Ibiza, S. et al. 2006). Le NO° est également capable de stimuler la cytotoxicité des cellules NK (Jyothi, M.D. and Khar, A. 1999) et d'induire la maturation (Paolucci, C. et al. 2003) et la survie (Perrotta, C. et al. 2004) des DC. Des études, *in vitro*, montrent que les cellules

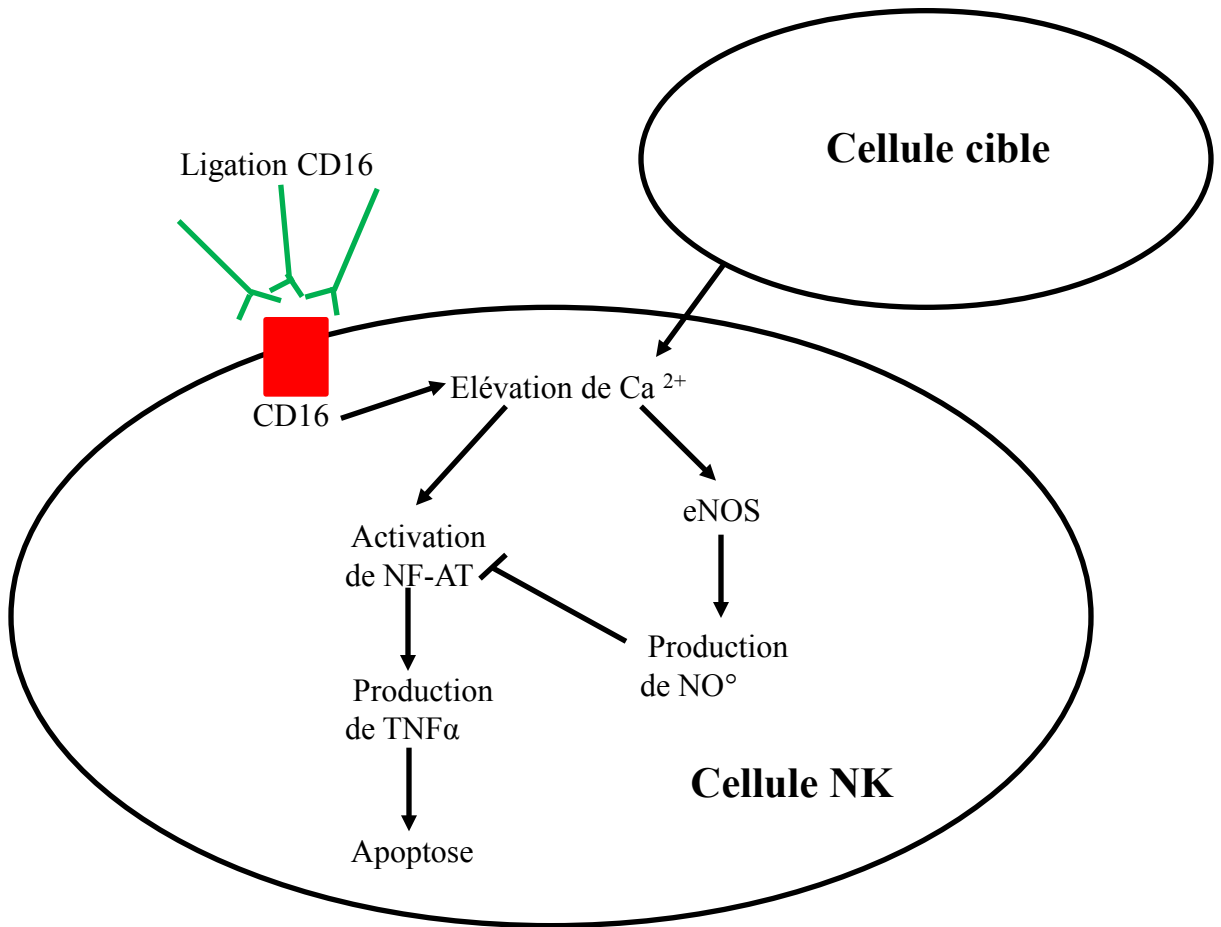


Figure 64 : **Action du NO° endogène dans les cellules NK**
(D'après Furuke, K. et al. 1999)

NK humaines stimulées ou non par l'IL-2 expriment constitutivement l'eNOS alors que l'iNOS n'est exprimée qu'en réponse à une stimulation par l'IL-12 ou par le TNF α (Xiao, L. et al. 1995; Furuke, K. et al. 1999). Dans ces modèles, l'arginine déclenche l'activité cytotoxique des cellules NK de manière dose dépendante.

L'inhibition non sélective des NOS par le N-monométhyl-L-arginine (L-NMA) réduit de façon dose dépendante la cytotoxicité des cellules NK préalablement activées ou non par l'IL-2. Ceci démontre la part active du NO $^{\circ}$ dans l'activité cytotoxique des cellules NK (Xiao, L. et al. 1995; Furuke, K. et al. 1999). Par ailleurs, l'inhibition spécifique d'iNOS par l'aminoguanidine dans les cellules NK est associée à une stimulation de l'activité lytique (Salvucci, O. et al. 1998). Ainsi, en absence d'induction d'iNOS ou en l'inhibant spécifiquement, la cytotoxicité des NK est accrue ce qui confirme l'implication d'eNOS dans la formation du NO $^{\circ}$ à partir de l'arginine. L'inhibition d'eNOS dans des cellules NK, dont la iNOS n'est pas induite, réduit leur activité cytotoxique (Furuke, K. et al. 1999). L'addition de faibles doses de S-nitroso-N-acétylpenicillamine (SNAP) (10 μ M), un agent donneur de NO $^{\circ}$, accroît la cytotoxicité des cellules NK (Ogawa, M. et al. 1998), alors que de fortes doses (100 à 25 μ M) provoquent l'inhibition de cette activité (Ito, M. et al. 1996). Lors du traitement par un inhibiteur des NOS, aucune altération des deux mécanismes majeurs de lyse des cellules cibles (voies perforine-dépendante et des récepteurs de mort) par les cellules NK n'est observée (Furuke, K. et al. 1999). Le NO $^{\circ}$ n'est donc pas indispensable au déclenchement des mécanismes lytiques des cellules NK. De plus, l'IL-2 est nécessaire au maintien de l'expression constitutive d'eNOS et à son activation (Furuke, K. et al. 1999). L'IL-2, associée à l'activation des cellules NK soit par contact avec des cellules cibles soit par un anticorps anti-CD16, potentialise la production de NO $^{\circ}$. Cette cytokine stimule donc l'activité de l'eNOS (Furuke, K. et al. 1999). L'inhibition des NOS induit l'apoptose des cellules NK. Le NO $^{\circ}$ intracellulaire, produit soit par la eNOS à partir de l'arginine ou indirectement apporté par le SNAP combiné à l'inhibition des NOS, protège les cellules NK de l'apoptose en inhibant la production de TNF α *via* le blocage du facteur de transcription NF-AT (Furuke, K. et al. 1999) (**Figure 64**).

iNOS est exprimée dans différents types de cellules néoplasiques humaines (mammaires et prostatiques) (Thomsen, L.L. et al. 1994; Thomsen, L.L. et al. 1995). La sur-expression d'iNOS, par transduction rétrovirale dans des cellules cancéreuses n'exprimant pas iNOS, inhibe leurs capacités proliférative et métastatique (Xie, K. and Fidler, I.J. 1998) et stimule l'induction de l'apoptose par le NO $^{\circ}$ (Kotamraju, S. et al. 2007). Toutefois, lorsque l'activité d'iNOS est inhibée dans des cellules tumorales, les résultats observés sont contradictoires avec soit une stimulation (Hu, D.E. et al. 2004) ou soit une inhibition (Takahashi, M. et al. 2006) du développement tumoral selon le type de tumeurs. L'effet anti-tumoral d'iNOS a notamment été mis en évidence dans une étude explorant les relations entre p53 et iNOS dans un modèle de lymphome (Hussain, S.P. et al. 2004). Les dommages à l'ADN

causé par le NO° induisent l'accumulation de p53 qui provoque l'arrêt de la prolifération et l'apoptose des cellules (Hussain, S.P. et al. 2003). Le gène suppresseur de tumeur p53 est muté chez 50% des cellules malignes et dans la plupart des cas ce phénomène réprime la fonction de p53 (Bullock, A.N. and Fersht, A.R. 2001). Dans ce modèle murin, les lymphomes se développent plus rapidement lorsque les souris sont déficientes à la fois pour iNOS et pour p53. Toutefois, chez les souris déficientes uniquement pour p53, le développement tumoral est moindre comparé à celui chez des souris déficientes pour iNOS et p53. Ceci suggère que le NO° est capable de limiter la cancérogenèse même lorsque le potentiel apoptotique est réduit par la délétion de p53 (Hussain, S.P. et al. 2004). La prolifération des cellules cancéreuses et l'apparition de métastases sont stimulées lorsque des tumeurs n'exprimant pas iNOS sont implantées chez des souris déficientes pour iNOS comparées à des souris sauvages. Ceci suggère que l'expression d'iNOS par les cellules hôtes inhibe la cancérogenèse (Shi, Q. et al. 2000; Wei, D. et al. 2003).

II-3-6-c Les NOS dans l'échappement tumoral

Les NOS exercent vis-à-vis des tumeurs un effet ambivalent soit inhibiteur comme nous l'avons vu précédemment soit stimulateur. Le taux d'expression des NOS et en particulier celui de l'iNOS au niveau tumoral est associé à un mauvais pronostic clinique pour les patients atteints de cancers du sein (Loibl, S. et al. 2005). Les cellules tumorales peuvent devenir résistantes au NO° suite à la pression de sélection exercée par le système immunitaire qui génère notamment des cellules tumorales mutantes pour le gène p53. La perte de l'activité répressive de p53 stimule l'expression d'iNOS qui favorise la mise en place d'un cercle vicieux à savoir une production accrue de NO°, une induction de dommages à l'ADN et un développement de nouvelles mutations (Ambs, S. et al. 1998; Hussain, S.P. et al. 2003). L'iNOS est exprimée au niveau tumoral dans différents types de cancer dont le cancer du sein (Loibl, S. et al. 2005). En ce qui concerne les autres NOS, une étude montre que sur 54 biopsies de cancer mammaire, 33 d'entre elles expriment l'eNOS ; cette expression est positivement corrélée à celle d'iNOS (Loibl, S. et al. 2002). Une autre étude démontre que ces deux enzymes sont non seulement présentes dans les tumeurs mammaires mais, aussi dans le micro-environnement tumoral (Vakkala, M. et al. 2000). La nNOS, quant à elle, est retrouvée dans différentes lignées cellulaires d'oligodendrogliome et de neuroblastome (Cobbs, C.S. et al. 1995).

La production de NO° par les cellules du micro-environnement ou les cellules tumorales favorise le développement des cellules transformées en stimulant l'angiogenèse (Bing, R.J. et al. 2001). En effet, l'inhibition des NOS, *in vitro*, diminue la prolifération des cellules endothéliales (Mocellin, S. et al. 2004) et la déplétion en arginine inhibe la vascularisation tumorale (Park, I.S. et al. 2003). Dans un modèle cancéreux murin, le NO° stabilise l'ARNm du VEGF ce qui favorise la sur-expression du VEGF dépendante du NO° et stimule l'angiogenèse tumorale (Ambs, S. et al. 1998). De

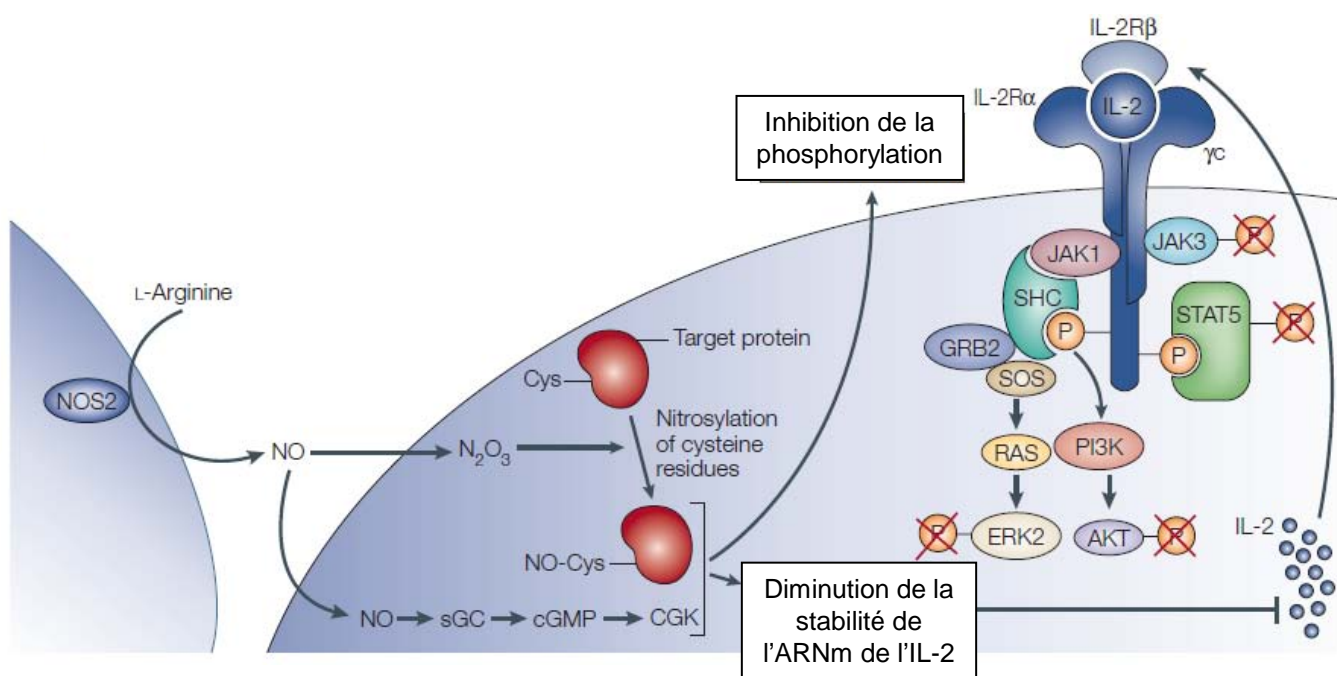


Figure 65 : **Inhibition par le NO° de l'activation des LT via la modulation des voies de signalisation de l'IL-2**
 (D'après Bronte, V. and Zanovello, P. 2005)

plus, l'expression d'iNOS dans des carcinomes colique et gastrique humains est corrélée positivement au taux de VEGF et à la densité des micro-vaisseaux (Ichinoe, M. et al. 2004). Des cellules humaines de carcinomes transfectées avec l'ADNc d'iNOS d'origine murin puis implantées chez des souris « nude » ont un développement et une néo-vascularisation tumorale importants (Thomsen, L.L. and Miles, D.W. 1998). Le NO° peut également stimuler le développement tumoral en modulant la production de prostaglandines. En effet, il active COX2 (Cianchi, F. et al. 2004) qui génère des prostaglandines susceptibles de stimuler l'angiogenèse et d'inhiber l'apoptose (Sheng, H. et al. 1998; Tsujii, M. et al. 1998). Le NO° peut également activer HIF-1 (Kimura, H. et al. 2000) et inversement HIF-1 est capable d'induire l'expression de différents gènes impliqués dans l'angiogenèse dont celui de l'iNOS (Semenza, G.L. 2003). De plus, étant donné que le NO° favorise l'expression de HIF-1 dans des conditions non hypoxiques (Kasuno, K. et al. 2004), il a été suggéré qu'un taux élevé de NO° dans le micro-environnement tumoral pourrait, comme en situation d'hypoxie, stimuler l'angiogenèse (Semenza, G.L. 2001). L'expression et l'activation des MMP sont également stimulées par le NO° favorisant ainsi le potentiel invasif des cellules tumorales (Ishii, Y. et al. 2003).

Le NO°, produit par les NOS des cellules tumorales ou des MSDC, participe également au développement tumoral en altérant la vigilance anti-tumorale. Il est capable d'inhiber la prolifération et l'activité cytotoxique des LT (Zhang, X.M. and Xu, Q. 2001) et la fonction des DC (Kuchel, J.M. et al. 2003). La réduction de l'activation des LT par le NO° passe notamment par la modulation de la voie de signalisation de l'IL-2 (Bronte, V. and Zanovello, P. 2005) (**Figure 65**). Le NO° est capable de réguler directement les protéines intracellulaires impliquées dans la signalisation par S-nitrosylation de résidus cystéine cruciaux, ou indirectement par l'activation de cyclases guanylates solubles et de protéines kinases cycliques GMP dépendantes (Bronte, V. and Zanovello, P. 2005). Ainsi, dans les LT, la phosphorylation, et par conséquent l'activation de protéines de la voie de signalisation de l'IL-2 telle que STAT 5, est bloquée par le NO° (Mazzoni, A. et al. 2002). De plus, le NO° réduit aussi la stabilité de l'ARNm de l'IL-2 et la sécrétion de cette cytokine par les LT activés (Bronte, V. and Zanovello, P. 2005). Dans un modèle de souris porteuses d'un carcinome mammaire, une sécrétion persistante de NO° par les MSDC est associée à une réduction de la transcription de STAT 5 dans les LT et les LB (Pericle, F. et al. 1997). Ceci conforte l'implication du NO° dans la moindre réactivité des LT. Le NO°, à forte concentration, est capable d'induire l'apoptose des LT *via* l'accumulation de p53 et l'activation des voies de signalisation dépendantes ou indépendantes des caspases (Macphail, S.E. et al. 2003).

II-3-6-d Les arginases dans l'échappement tumoral

Une sur-expression tumorale des arginases est retrouvée dans plusieurs types de cancer tels que le cancer du sein (Singh, R. et al. 2000). Cette expression intra-tumorale pourrait stimuler la

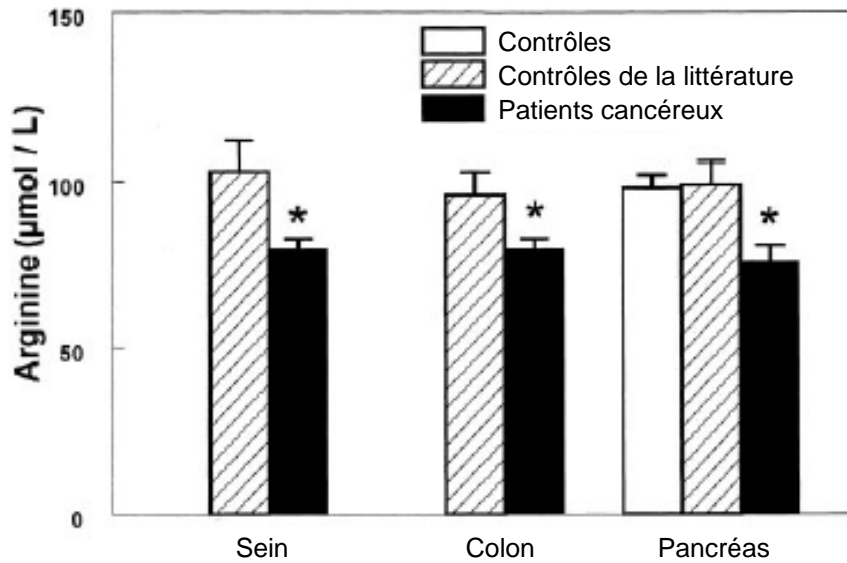


Figure 66 : **Evaluation de l'argininémie chez des patients cancéreux**
(D'après *Visser, Y.L. et al. 2005*)

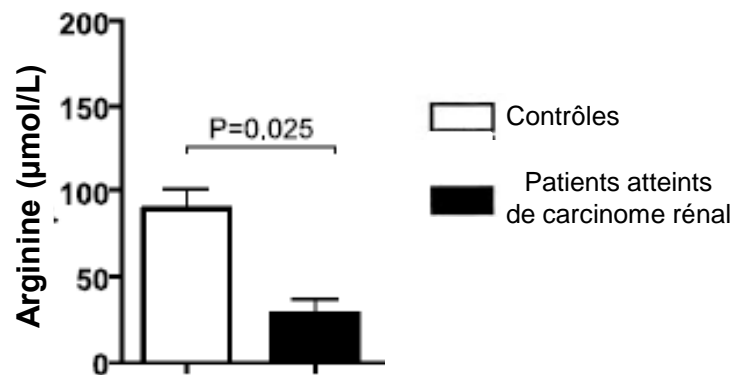


Figure 67 : **Argininémie des patients atteints de carcinome rénal**
(D'après *Zea, A.H. et al. 2005*)

prolifération des cellules tumorales *via* la production de polyamines et l'inhibition des cellules immunes infiltrées dans la tumeur (Bronte, V. and Zanovello, P. 2005; Rodriguez, P.C. and Ochoa, A.C. 2008). La sur-expression des arginases par les TAM (Davel, L.E. et al. 2002) stimule également la prolifération tumorale (Chang, C.I. et al. 2001). En effet, la néo-vascularisation des tumeurs dépendantes des TAM requièrent la synthèse de polyamines produites en réponse à l'expression accrue des deux isoformes d'arginases (I et II) (Davel, L.E. et al. 2002). De plus, la PGE₂, sécrétée par les tumeurs, stimule l'expression d'arginase I dans les TAM, enzyme responsable de la consommation d'arginine aux niveaux intra et extracellulaires (Rodriguez, P.C. et al. 2005). Le micro-environnement tumoral contient des MSDC qui contribuent au développement tumoral de part leur expression d'arginase I. En effet, la déplétion locale en arginine est responsable de l'inhibition des LT (Rodriguez, P.C. et al. 2004). Les MSDC, présentes dans la moelle osseuse des souris saines, s'accumulent dans la rate et la tumeur des souris porteuses de cancer (Kusmartsev, S. et al. 2004; Sinha, P. et al. 2005). Les cellules tumorales expriment la COX2 et sécrètent de la PGE₂ qui stimule l'expression de l'arginase I et de CAT 2B dans les cellules MDSC provoquant ainsi une déplétion locale en arginine (Rodriguez, P.C. et al. 2003; Rodriguez, P.C. et al. 2004; Rodriguez, P.C. et al. 2005; Rodriguez, P.C. and Ochoa, A.C. 2006). La réduction des teneurs en arginine au niveau plasmatique et/ou du micro-environnement tumoral résulte également du relargage d'arginase I par les MSDC (Munder, M. et al. 2005) et les polynucléaires neutrophiles lors de leur apoptose (Munder, M. et al. 2006). Dans certains cancers comme celui du sein, du pancréas, du colon et des reins, la chute de l'argininémie (Visser, Y.L. et al. 2005; Zea, A.H. et al. 2005) (**Figures 66 et 67**) est souvent associée à une anergie des LT et/ou des cellules NK (Baniyash, M. 2004). De plus, l'injection d'un inhibiteur des arginases le N-Hydroxy-nor-L-Arg (Nor-NOHA) ou de l'arginase I le N-Hydroxy-L-Arg (NOHA) à des souris porteuses d'un carcinome pulmonaire prévient la perte de fonction des LT et réduit le développement tumoral de façon dose dépendante. Cela confirme le rôle des arginases et notamment de l'arginase I dans l'inhibition de la réponse immunitaire anti-tumorale *via* la déplétion en arginine (Rodriguez, P.C. et al. 2004).

L'altération fonctionnelle des LT en réponse à la déplétion en arginine résulte d'un arrêt de leur prolifération et d'une diminution de l'expression de la chaîne CD3 ζ de leur TCR. La chaîne CD3 ζ est impliquée dans la transmission du signal activateur (Rodriguez, P.C. et al. 2002; Rodriguez, P.C. et al. 2004; Zea, A.H. et al. 2004; Rodriguez, P.C. et al. 2007). Une réduction de la stabilité de l'ARNm de la chaîne CD3 ζ est à l'origine de la sous-expression de ce peptide à la surface des LT (Rodriguez, P.C. et al. 2002). La chaîne CD3 ζ est également présente dans les récepteurs activateurs NKp30, NKp46 et CD16 des cellules NK où elle joue un rôle important dans leur fonction (Moretta, A. et al. 2001). Même si une sous-expression de la chaîne CD3 ζ à la surface des cellules NK est observée dans différents cancers (Baniyash, M. 2004), aucune étude ne montre que cette réduction est consécutive à

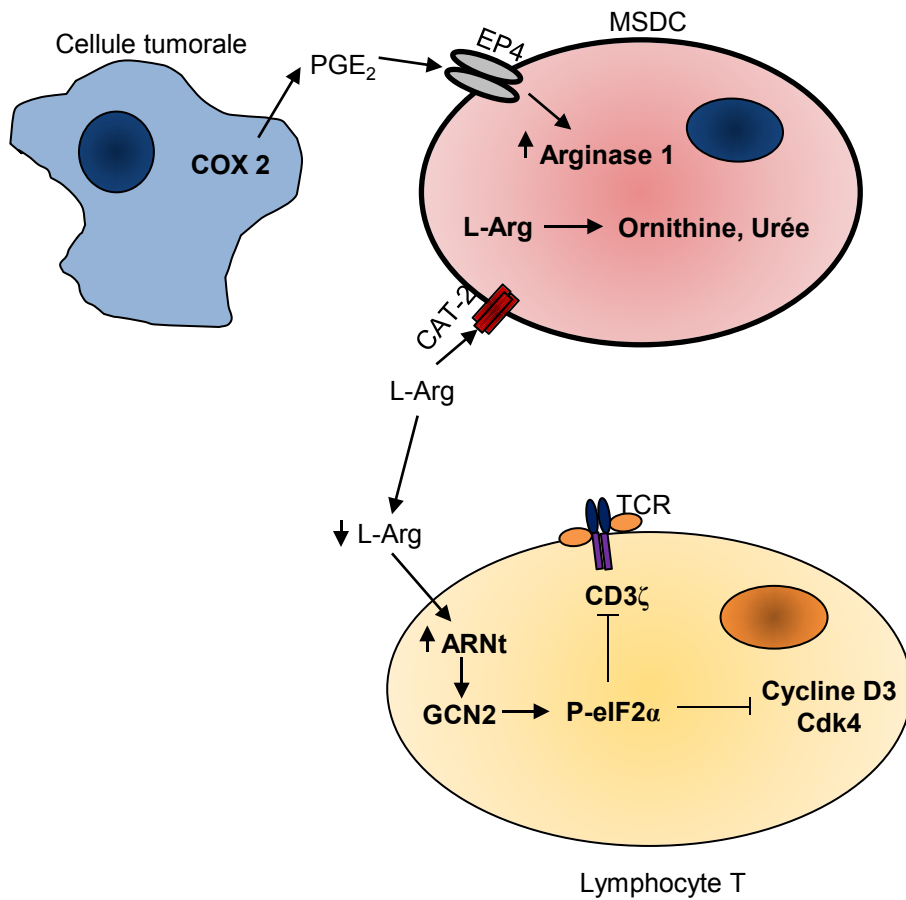


Figure 68 : **Dysfonctionnement des lymphocytes T induit par l'arginase I des cellules suppresseurs dérivées des myéloïdes (MSDC)**

(D'après Rodriguez, P.C. and Ochoa, A.C. 2008)

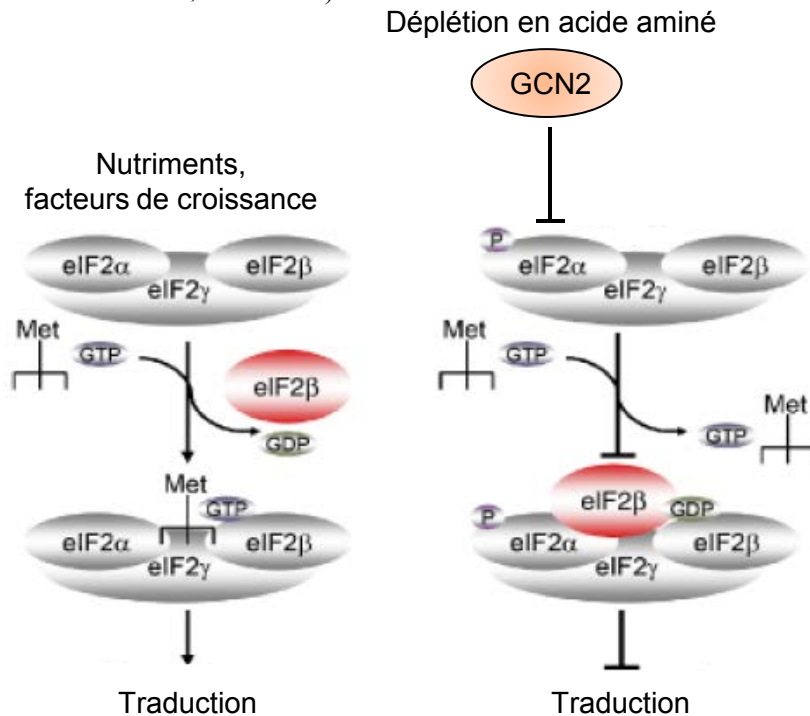


Figure 69 : **Contrôle de la traduction par eIF2α**

(D'après Rodriguez, P.C. and Ochoa, A.C. 2008)

la déplétion en arginine. Des LT cultivés en l'absence d'arginine stoppent leur cycle cellulaire en phase G0-G1 alors qu'en présence de cet acide aminé ils progressent dans le cycle cellulaire et par conséquent prolifèrent (Rodriguez, P.C. et al. 2007). De plus, l'ajout d'arginine dans le milieu à des concentrations physiologiques lève l'arrêt du cycle cellulaire (Rodriguez, P.C. et al. 2007).

Dans les cellules eucaryotes, les kinases dépendantes des cyclines, les « cyclin-dependent kinases » 4 (cdk4) et 6 (cdk6), sont associées à des cyclines de type D (cycline D1, D2 et D3) et régulent la progression des cellules dans les phases G1 et S du cycle cellulaire (Kato, J.Y. 1997). Cette régulation nécessite l'inactivation du complexe inhibiteur cycline-D/cdk et la phosphorylation de protéines de la famille Rb. Les protéines Rb, une fois phosphorylées par le complexe cyclin-D/cdk, induisent la libération des facteurs de transcription E2F qui sont alors transloqués dans le noyau et provoquent l'expression de gènes favorisant la progression des cellules dans les phases G1 et S du cycle (Ekholm, S.V. and Reed, S.I. 2000). Les LT activés et cultivés en absence d'arginine sous-expriment l'ARNm de la cycline D3 et de cdk4 mais, ne modulent pas la transcription de cdk6. Dans ces cellules, la stabilité de l'ARNm ainsi que la traduction de la cycline D3 sont également réduites. De plus, la sous-expression de la cycline D3 provoque la réduction de la phosphorylation des protéines Rb et la diminution de la translocation nucléaire d'E2F-1. Cela suggère que la réduction au niveau extracellulaire du taux d'arginine, sous l'action de l'arginase I, inhibe la prolifération des LT *via* la sous-expression de la cycline D3 et de cdk4 par des mécanismes transcriptionnels, post-transcriptionnels et traductionnels (Rodriguez, P.C. et al. 2007) (**Figure 68**).

Comme nous l'avons vu pour le tryptophane avec l'IDO, une réduction de la disponibilité en acides aminés est capable d'inhiber la traduction de protéines et de réduire la stabilité des ARNm *via* l'activation de la voie de signalisation GCN2 (Munn, D.H. et al. 2005). Cette dernière est impliquée dans la baisse de l'expression de la chaîne CD3 ζ des LT et pourrait également contribuer à la sous-expression de la cycline D3 et de cdk4 (Rodriguez, P.C. and Ochoa, A.C. 2008) (**Figure 68**). L'accumulation des ARNt suite à une déplétion en acide(s) aminé(s) provoque l'activation de GCN2 qui phosphoryle le facteur d'initiation de la traduction « l'eukaryotic translation initiation factor 2 α » (eIF2 α). Cette forme phosphorylée d'eIF2 α se lie à eIF2 β . Ce dernier est donc incapable de transformer le GDP du complexe eIF2 en GTP ce qui bloque la fixation de l'ARNt de l'aminocyl méthionine sur le complexe eIF2 provoquant l'inhibition de l'initiation de la traduction (**Figure 69**) (Kimball, S.R. 2001). Une augmentation de la phosphorylation d'eIF2 α est observée chez des LT activés et cultivés en absence d'arginine. De plus, les LT de souris déficientes en GCN2 ne sont pas bloqués dans le cycle cellulaire et sont incapables de sur-exprimer la cycline D3 et la cdk4 lorsqu'ils sont cultivés en absence d'arginine. Ceci suggère l'implication de GCN2 dans la réduction de la prolifération des LT lors d'une déplétion en arginine (Rodriguez, P.C. et al. 2007). La baisse de la concentration d'arginine et l'augmentation de l'urée, produit de dégradation de l'arginine, inhibent

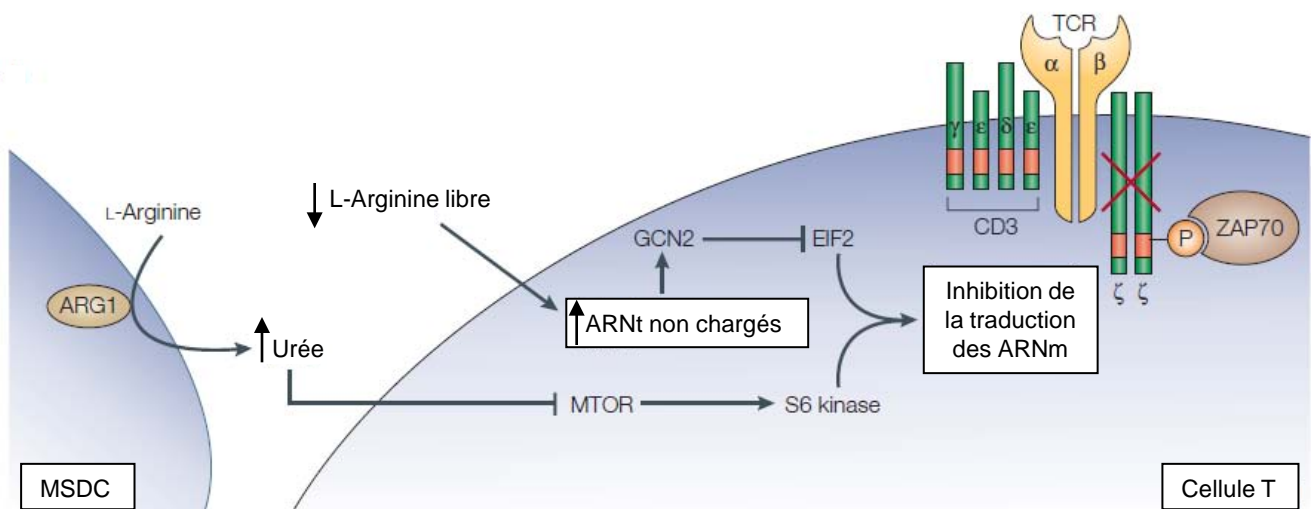


Figure 70 : **Inhibition par la déplétion en arginine de l'activation des LT via la régulation de la traduction**
(D'après Bronte, V. and Zanovello, P. 2005)

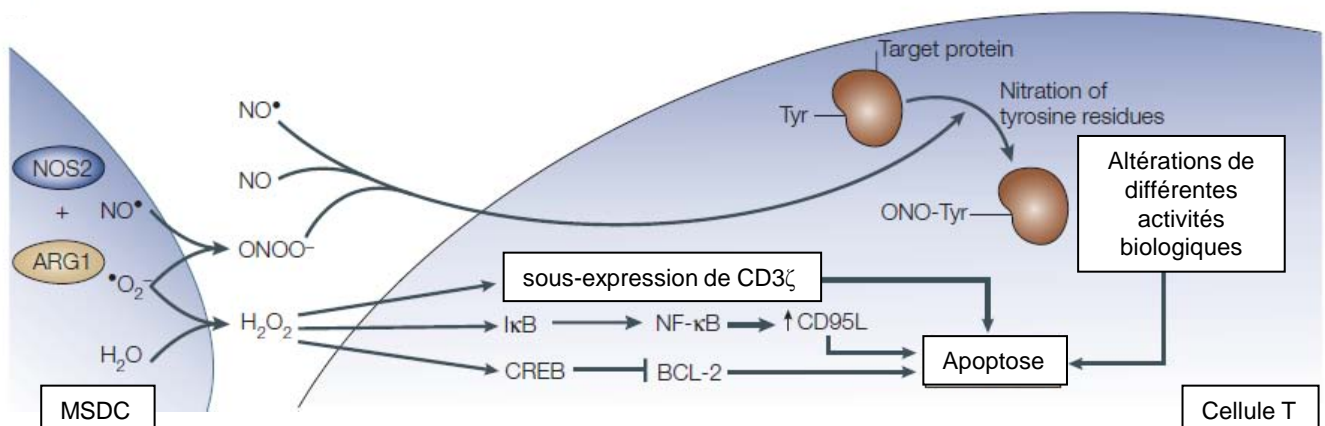


Figure 71 : **Inhibition de la réponse des LT par les espèces réactives de l'oxygène**
(D'après Bronte, V. and Zanovello, P. 2005)

également l'activité de la protéine « mammalian target of rapamycin » (mTOR) essentielle à l'initiation de la traduction *via* la protéine ribosomale S6 kinase (Rohde, J. et al. 2001; Gao, X. et al. 2002) (**Figure 70**). La voie mTOR pourrait donc également contribuer à la moindre expression de la chaîne CD3 ζ , de la cycline D3 et de la cdk4.

La déplétion en acides aminés ne réprime pas totalement la traduction des protéines mais, interfère spécifiquement avec certains programmes cellulaires (Fafournoux, P. et al. 2000). En effet, des facteurs de transcription sont sur-exprimés (ATF-2, ATF-4 et CHOP) (Averous, J. et al. 2004) alors que des voies de signalisation, comme celle de mTOR, sont inhibées (Rohde, J. et al. 2001). La spécificité de la réponse à la déplétion en acides aminés est en partie médiée par les éléments de réponse aux acides aminés (AARE) situés dans la région promotrice de certains facteurs de transcription (Averous, J. et al. 2004). Contrairement aux LT, l'absence d'arginine n'active pas GCN2 dans les cellules NK humaines stimulées avec de l'IL-2 (Oberlies, J. et al. 2009). Peu d'études se sont intéressées à l'impact d'une déplétion en arginine sur la fonctionnalité des cellules NK. Toutefois, il a été rapporté que la réduction du taux de cet acide aminé inhibe de façon dose dépendante la prolifération des cellules NK humaines activées et qu'une totale déplétion réduit la sécrétion d'IFN- γ (Oberlies, J. et al. 2009). En ce qui concerne l'activité cytotoxique des cellules NK, les résultats sont contradictoires. En effet, une étude rapporte une diminution de l'activité lytique des cellules NK de façon dépendante de la concentration d'arginine (Xiao, L. et al. 1995) alors qu'une autre étude démontre que l'absence de cet acide aminé n'altère pas l'activité cytotoxique (Oberlies, J. et al. 2009).

II-3-6-e Coopération des NOS et des arginases dans l'immunosuppression

Les cellules MSDC infiltrants les tumeurs sont capables de co-exprimer l'arginase I et l'iNOS (Bronte, V. and Zanovello, P. 2005). Suite à la déplétion en arginine, ces enzymes induisent la production d'anion superoxyde ($O_2^{\bullet -}$) et de NO^{\bullet} qui forment ensuite du peroxynitrite ($ONOO^{\bullet}$) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Bronte, V. and Zanovello, P. 2005) (**Figure 71**).

Le peroxynitrite est responsable de la nitration des résidus tyrosines des protéines affectant ainsi diverses activités biologiques comme l'activation ou l'inactivation d'enzymes impliquées dans la différenciation et la prolifération cellulaires (Schopfer, F.J. et al. 2003; Radi, R. 2004). *In vitro*, il provoque l'apoptose des LT par inhibition de la phosphorylation d'importantes protéines de signalisation *via* la nitration de leurs résidus tyrosine (Brito, C. et al. 1999). A forte dose, il induit également la mort cellulaire des LT par la nitration de canaux anioniques voltage dépendant causant ainsi des dommages mitochondriaux qui favorisent le relargage de cytochrome *c* (Aulak, K.S. et al. 2001). De plus, des lymphocytes infiltrés au sein d'un carcinome prostatique expriment au niveau intracellulaire des taux élevés de résidus nitrotyrosine. Les tissus épithéliaux néoplasiques de la

prostate sur-expriment l'arginase I et l'iNOS et l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de ces deux enzymes provoque une réduction du taux de résidus nitrotyrosine dans les LT et restaure localement la réponse anti-tumorale des LT (Bronte, V. et al. 2005).

Le peroxyde d'hydrogène produit par les MDSC participe également à l'échappement tumoral par l'inhibition des LT. En effet, suite à la production de ROS et notamment d'H₂O₂, les MDSC issues de rate de souris porteuses de cancer inhibent l'expression de la chaîne CD3ζ et la production d'IFN-γ par les LT (Kusmartsev, S. et al. 2005; Sinha, P. et al. 2005). Chez des patients à un stade avancé de cancer, la production d'H₂O₂ par des cellules granuleuses circulantes est associée à une diminution de l'expression de la chaîne CD3ζ et de l'activité des LT (Schmielau, J. and Finn, O.J. 2001). Par ailleurs, l'expression d'arginase I a été observée dans les MDSC de patients atteints d'un cancer rénal (Zea, A.H. et al. 2005). L'ensemble de ces données suggère que les MDSC chez le patient cancéreux sont capables d'inhiber les LT *via* leur production d'H₂O₂. Ce dernier induit également l'apoptose des LT activés en inhibant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Hildeman, D.A. et al. 2003) et en stimulant la sécrétion de Fas-L (ou CD95L) qui se fixe alors aux récepteurs de mort Fas présents à la surface des LT (Krammer, P.H. et al. 2007) (**Figure 71**).

II-3-7 La leptine

La leptine, une protéine de 16 kDa sécrétée majoritairement par le tissu adipeux, est impliquée dans le métabolisme énergétique et le contrôle de l'appétit *via* ses effets sur l'hypothalamus (Zhang, Y. et al. 1994; Woods, S.C. et al. 1998). Elle participe également au développement tumoral (Jarde, T. et al. 2009; Jarde, T. et al. 2011) et module certaines cellules de l'immunité innée (Caldefie-Chezet, F. et al. 2001; Caldefie-Chezet, F. et al. 2003; Fernandez-Riejos, P. et al. 2010). L'adipocyte représente la composante cellulaire majoritaire du stroma mammaire. Le cancer du sein est de loin le cancer le plus fréquent chez les femmes avec environ 1,38 million de nouveaux cas diagnostiqués en 2008 (23% de tous les cancers) (Ferlay, J. et al. 2010). Même si les premiers stades de carcinogenèse mammaire prennent place dans un environnement riche en adipocytes, les études sur les interactions entre adipocytes, cellules tumorales et système immunitaire sont rares sans doute parce que l'adipocyte a été très longtemps considéré comme une cellule inerte limitée au stockage des lipides (Celis, J.E. et al. 2005). Depuis la découverte de la leptine (Zhang, Y. et al. 1994), le rôle de l'adipocyte s'est considérablement élargi. En effet, *en sus* de sa fonction de stockage des triglycérides, les adipocytes sont également des cellules sécrétoires. Les sécrétions adipocytaires sont soit d'origine protéique comme la leptine et soit d'origine lipidique comme les acides gras non estérifiés (Celis, J.E. et al. 2005). La plupart des facteurs protéiques sécrétés appartiennent à la famille des cytokines et sont qualifiés d'adipokines. Des données épidémiologiques suggèrent que le tissu adipeux aurait un rôle important mais, encore controversé dans l'apparition et le pronostic de nombreux cancers. Ce rôle

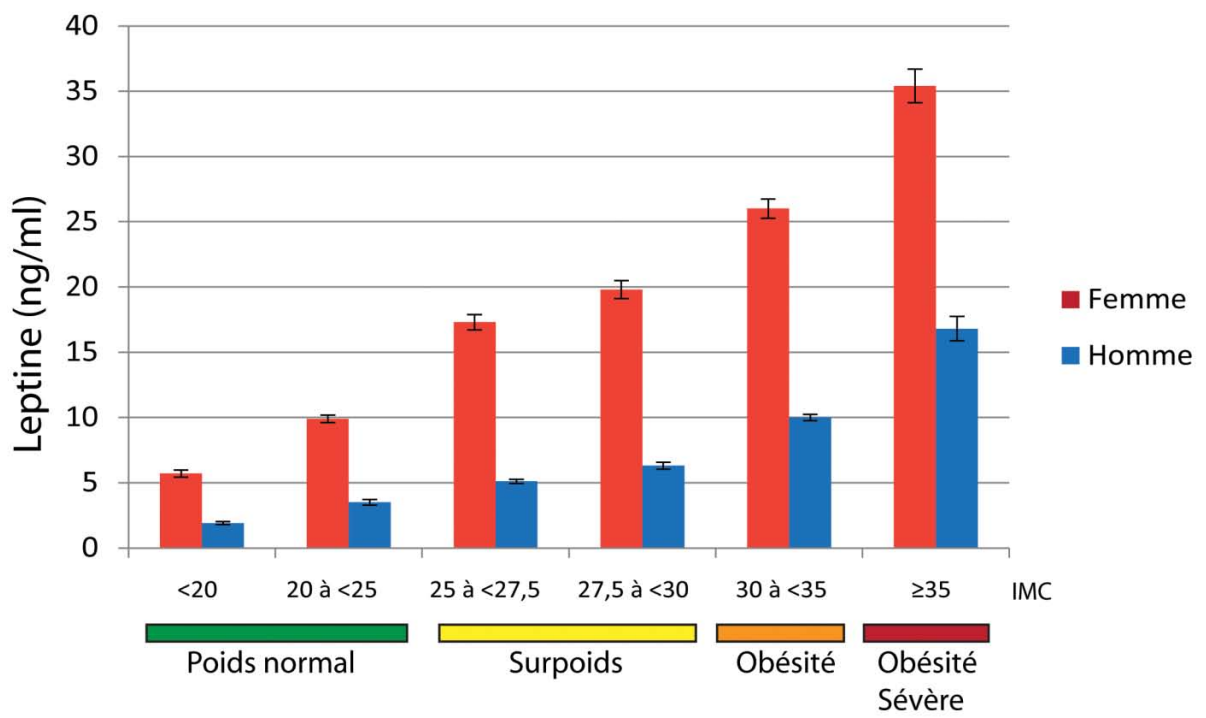


Figure 72 : Evolution de la leptinémie selon l'indice de masse corporelle
(D'après Ruhl, C.E. and Everhart, J.E. 2001)

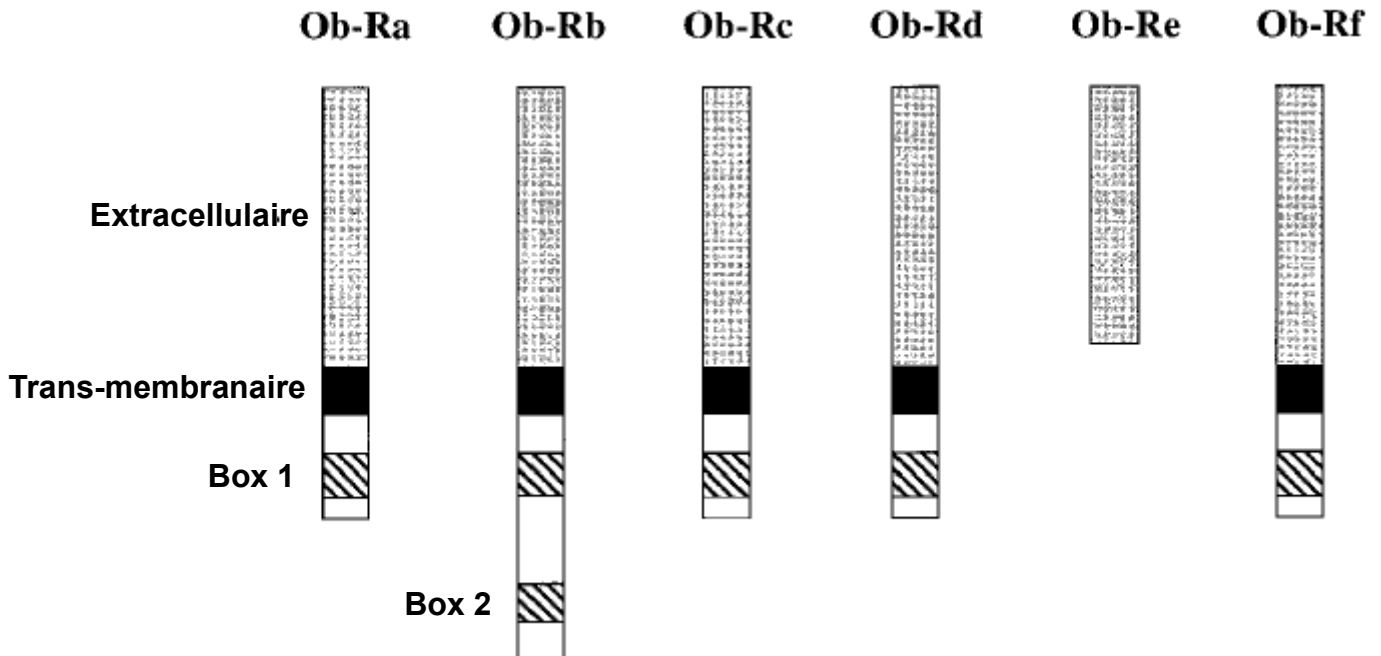


Figure 73 : Structure des isoformes du récepteur de la leptine
(D'après Ahima, R.S. and Flier, J.S. 2000)

dépendrait des sécrétions adipocytaires (Schaffler, A. et al. 2007; Roberts, D.L. et al. 2010), et en particulier celle de la leptine (Wu, M.H. et al. 2009).

Des études, effectuées notamment dans notre équipe de recherche, ont montré que la leptine stimule, *in vitro*, la prolifération de différents types de cellules cancéreuses mammaires (Jarde, T. et al. 2009; Jarde, T. et al. 2011) et favorise l'invasion et l'angiogenèse tumorale dans plusieurs modèles animaux (Mauro, L. et al. 2007; Jarde, T. et al. 2011). Dans l'espèce humaine, la leptinémie est environ 3 fois plus importante chez la femme que chez l'homme (**Figure 72**) (Saad, M.F. et al. 1997). Lorsqu'elle est rapportée au pourcentage de masse grasse, les femmes présentent un taux circulant de leptine supérieur de 40% à celui observé chez l'homme (Saad, M.F. et al. 1997). Cela pourrait être dû à une production plus importante de leptine par le tissu adipeux sous-cutané plus développé chez la femme et à une régulation hormonale de la sécrétion leptinique par les œstrogènes et/ou la testostérone (Ahima, R.S. and Osei, S.Y. 2004).

Ainsi la leptinémie est corrélée positivement à l'IMC (**Figure 72**) et une relation encore plus marquée est retrouvée entre les taux circulants de cette adipokine et le pourcentage de masse grasse (Gomez, J.M. et al. 2003; Mahabir, S. et al. 2007). L'expression de l'ARNm de la leptine par les adipocytes est supérieure chez des patients présentant une obésité morbide ($IMC > 40 \text{ kg/m}^2$) comparativement à des sujets de corpulence normale ($20 < IMC < 25 \text{ kg/m}^2$) (Hamilton, B.S. et al. 1995). Chez les femmes de poids normal ($20 < IMC < 25 \text{ kg/m}^2$), la concentration plasmatique de leptine est d'environ 10 ng/mL, contrairement aux patientes en surpoids ($25 < IMC < 30 \text{ kg/m}^2$) ou obèses ($IMC > 30 \text{ kg/m}^2$) pour lesquelles les taux circulants s'échelonnent entre 18 et 35 ng/mL (Ruhl, C.E. and Everhart, J.E. 2001). En situation d'obésité morbide ($IMC > 40 \text{ kg/m}^2$) la leptinémie peut atteindre des valeurs extrêmes de 51 ng/mL voire de 169 ng/mL (Liuzzi, A. et al. 1999).

II-3-7-a Les récepteurs de la leptine

La leptine induit ses effets en se liant à son récepteur (Ob-R) dont il existe six isoformes (Ob-Ra à Ob-Rf) issues de l'épissage alternatif du transcrit du gène Ob-R (Ahima, R.S. and Flier, J.S. 2000) (**Figure 73**). Chacune est composée d'un domaine extracellulaire possédant le site de liaison, à l'exception d'Ob-Re, et d'un domaine trans-membranaire similaire (Ahima, R.S. and Flier, J.S. 2000; Fruhbeck, G. 2006). La partie cytoplasmique permet de les différencier en trois groupes : les isoformes courtes (Ob-Ra, Ob-Rc, Ob-Rd et Ob-Rf), l'isoforme longue (Ob-Rb) et l'isoforme soluble (Ob-Re) (Ahima, R.S. and Flier, J.S. 2000; Fruhbeck, G. 2006) (**Figure 73**).

La fonction des isoformes courtes est actuellement mal définie mais, certaines comme Ob-Ra, seraient susceptibles d'activer des voies de signalisation en réponse à la leptine malgré un domaine intracellulaire tronqué (Bjorbaek, C. et al. 1997).

L'isoforme longue Ob-Rb présente un domaine cytoplasmique complet et a longtemps été considérée comme le seul récepteur fonctionnel de la leptine (Tartaglia, L.A. et al. 1995). Le récepteur Ob-Rb est essentiel dans la transmission du signal leptinique, puisqu'il contient les domaines intracellulaires requis pour activer de nombreuses voies de signalisation qui seront détaillées ci-dessous (Myers, M.G. et al. 2008). Les isoformes courtes et longues présentent un domaine intracellulaire conservé de 29 acides aminés appelé Box1 mais, seule l'isoforme longue possède le motif Box2 et le site de fixation de STAT et SHP-2 (Cirillo, D. et al. 2008).

L'isoforme soluble Ob-Re ne comprend pas de domaines transmembranaire et cytoplasmique. Ce récepteur est essentiellement retrouvé dans le plasma chez l'homme et est capable de fixer la leptine circulante (Chua, S.C., Jr. et al. 1997). Ainsi, dans le sérum, Ob-Re est la protéine majoritaire de fixation de la leptine (Lammert, A. et al. 2001). La fonction de cette isoforme serait de diminuer la proportion de leptine libre dans le plasma et ainsi réguler son activité biologique (Tu, H. et al. 2008).

II-3-7-b La leptine et les cellules cancéreuses mammaires

L'expression de l'ARNm d'Ob-Rb et d'Ob-Ra a été mise en évidence dans différentes lignées cancéreuses mammaires (Frankenberry, K.A. et al. 2006; Jarde, T. et al. 2009). L'expression protéique de ces deux récepteurs a été confirmée dans la plupart de ces lignées dont celles de MCF-7 et de MDA-MB-231 (Jarde, T. et al. 2009; Jarde, T. et al. 2011). La leptine et son récepteur ont été également retrouvés dans des biopsies de tumeurs mammaires et dans le tissu sain environnant la tumeur suggérant que la leptine peut agir localement sur les cellules cancéreuses selon un mode d'action autocrine et/ou paracrine (Jarde, T. et al. 2008a; Jarde, T. et al. 2008b; Jarde, T. et al. 2009). Par ailleurs, l'expression de la leptine dans le tissu cancéreux est corrélée à celle de son récepteur (Jarde, T. et al. 2008b).

L'inactivation du gène de la leptine et de son récepteur dans des modèles animaux a permis d'élucider le rôle de la leptine dans la pathologie cancéreuse mammaire. Ainsi, des souris obèses déficientes pour le gène de la leptine ($lep^{-/-}$ ou ob/ob) et sur-exprimant le facteur TGF- α spécifiquement au niveau du tissu mammaire, ne développent pas de tumeur mammaire contrairement aux souris non obèses $lep^{+/+}$ et $lep^{+/-}$ chez qui la prolifération tumorale est observée dans 50% et 67% des cas respectivement (Cleary, M.P. et al. 2003). Des souris obèses déficientes pour le gène Ob-R ($Ob-R^{-/-}$ ou db/db) ne développent pas de tumeur mammaire induite, contrairement aux souris non obèses homozygotes et hétérozygotes chez qui une amplification tumorale a lieu dans 69% et 82% des cas respectivement (Cleary, M.P. et al. 2004). Outre leurs effets sur la prolifération tumorale, il est également important de noter que la présence de la leptine et de son récepteur est essentielle au développement normal du tissu mammaire (Cleary, M.P. et al. 2003; Cleary, M.P. et al. 2004).

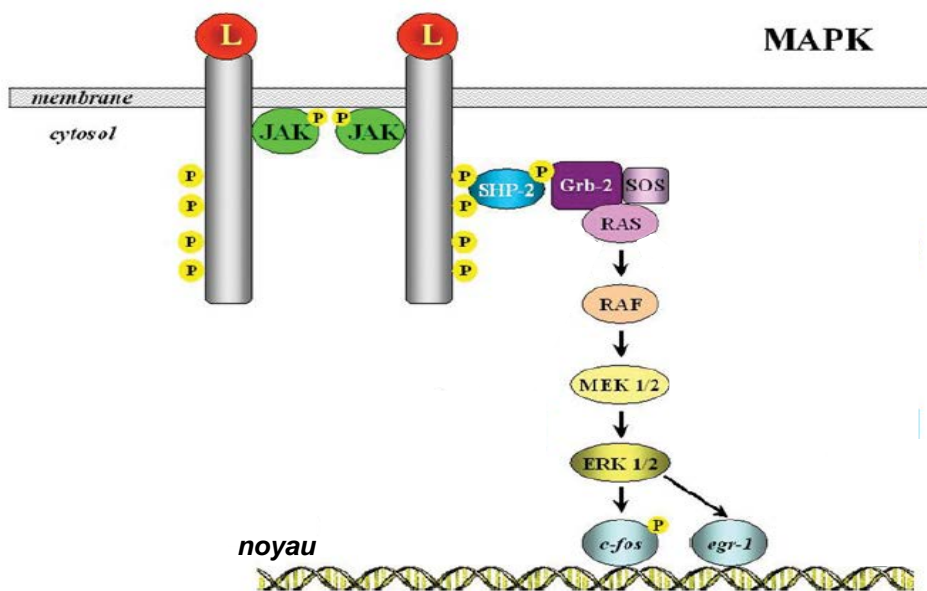


Figure 74 : **Induction de la voie MAPK par la leptine**
(D'après Fruhbeck, G. 2006)

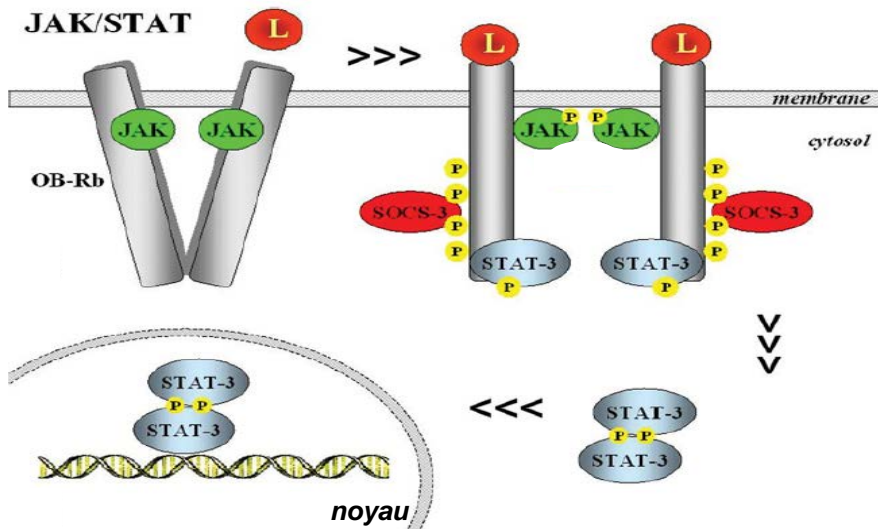


Figure 75 : **Induction de la voie JAK/STAT par la leptine**
(D'après Fruhbeck, G. 2006)

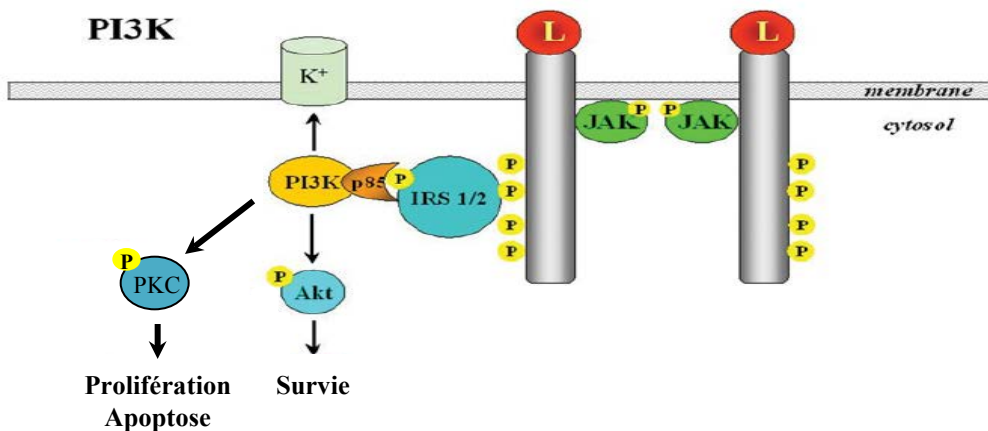


Figure 76 : **Induction de la voie PI3K par la leptine**
(D'après Fruhbeck, G. 2006)

Après fixation sur son récepteur, la leptine induit une activité proliférative *via* plusieurs voies de signalisation (Fruhbeck, G. 2006). En effet, la leptine est capable d'activer la voie des MAPK induisant la transcription de gènes cibles tels que c-fos et egr-1 impliqués dans les processus de prolifération et de différenciation cellulaires (**Figure 74**) (Fruhbeck, G. 2006). Dans différentes lignées tumorales mammaires telles que MCF-7 et T47D, la leptine stimule la phosphorylation de ERK1 et de ERK2 qui sont des acteurs de la voie de signalisation MAPK (Yin, N. et al. 2004; Chen, C. et al. 2006). De plus, des inhibiteurs dirigés contre la voie des MAPK, inhibent totalement l'activité proliférative de la leptine (Yin, N. et al. 2004; Chen, C. et al. 2006). Cela suggère que la leptine participe au développement tumoral par l'activation de cette voie de signalisation.

La leptine peut également stimuler la voie de signalisation JAK/STAT (Fruhbeck, G. 2006; Cirillo, D. et al. 2008). La phosphorylation de la partie cytoplasmique d'Ob-R après fixation de la leptine induit l'activation de JAK qui recrute alors les protéines STAT. Ces dernières sont ensuite activées par phosphorylation et se dissocient du récepteur afin de former des homodimères capables d'atteindre le noyau (Fruhbeck, G. 2006; Cirillo, D. et al. 2008) (**Figure 75**). Une fois passés la membrane nucléaire, les homodimères de STAT stimulent la transcription de gènes tels que c-myc, cyclin D1 et Bcl2 essentiels à la régulation du cycle cellulaire et de la prolifération (Cirillo, D. et al. 2008). Dans les cellules tumorales mammaires, la leptine induit l'expression des ARNm de la cycline D1 et de c-myc et l'expression protéique de la cycline D1 (Yin, N. et al. 2004; Chen, C. et al. 2006). De plus, la phosphorylation de STAT 3, induite par la leptine, active la transcription de la cycline D1 (Saxena, N.K. et al. 2007) et de c-myc (Yin, N. et al. 2004) dans les cellules tumorales mammaires MCF-7. Par conséquent, les propriétés stimulatrices de la leptine vis-à-vis des cellules cancéreuses mammaires sont régulées par la voie de signalisation JAK/STAT.

La leptine est aussi capable de stimuler la voie de signalisation IRS/PI3K. Suite à la fixation de la leptine, les récepteurs Ob-Ra et Ob-Rb, sont susceptibles d'activer les protéines « insulinerceptor substrat » 1 et 2 (IRS 1 et 2) *via* les JAK ou de façon autonome (Bjorbaek, C. et al. 1997). Une fois activées, IRS 1 et 2 stimulent la PI3K qui elle-même est susceptible de stimuler plusieurs autres protéines dont Akt et la PKC (Fruhbeck, G. 2006) (**Figure 76**). Akt joue un rôle prépondérant dans de nombreux processus comme la survie et le métabolisme cellulaires ; la PKC intervient dans les phénomènes prolifératif et apoptotique et est capable d'activer la voie des MAPK (Fruhbeck, G. 2006). La stimulation de la prolifération cellulaire induite par la leptine au niveau des cellules cancéreuses mammaires HTB-26 et ZR-75-1 est abolie par l'utilisation d'inhibiteurs de la voie de signalisation PI3K/Akt (Chen, C. et al. 2006). De plus, la leptine accroît l'expression protéique de la PKC- α dans les cellules MCF-7 (Okumura, M. et al. 2002). Ces données suggèrent que l'activité de la leptine dans les cellules cancéreuses mammaires passe également par la voie PI3K.

Il est important de noter que la leptine participe également au développement tumoral en inhibant l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs tels que p53 et p21 (Chen, C. et al. 2006), en induisant l'expression protéique de VEGF-R2 et en favorisant la sécrétion de VEGF (Gonzalez, R.R. et al. 2006).

II-3-7-c La leptine et les cellules immunitaires

Outre des effets sur les cellules tumorales, la leptine module également les cellules du système immunitaire. En effet, une altération de la réponse immunitaire et une susceptibilité aux infections ont été rapportées chez des animaux déficients en leptine ou en son récepteur et chez des sujets déficients en leptine (La Cava, A. and Matarese, G. 2004). Des récepteurs de la leptine ont été décrits au niveau des cellules immunitaires telles que les monocytes (Zarkesh-Esfahani, H. et al. 2001), les polynucléaires neutrophiles (Caldefie-Chezet, F. et al. 2001), les DC (Mattioli, B. et al. 2005), les lymphocytes B et T (Lord, G.M. et al. 1998; Martin-Romero, C. et al. 2000) mais, également les cellules NK (Zhao, Y. et al. 2003; Wrann, C.D. et al. 2012).

Ainsi la leptine stimule, *in vitro*, la prolifération et l'activation des monocytes en induisant l'expression à leur surface de marqueurs d'activation tels que le CD25 ou le CD71 (récepteur de la transferrine) et en stimulant l'expression de molécules d'adhérence (CD11b et c) et du CMH (HLA-DR) (Santos-Alvarez, J. et al. 1999). Cette adipokine stimule également la production par les monocytes/macrophages, de NO°, d'eicosanoïdes tels que le leucotriène B4 ou la PGE2 (Raso, G.M. et al. 2002; Mancuso, P. et al. 2004) et de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α et l'IL-6 (Loffreda, S. et al. 1998; Santos-Alvarez, J. et al. 1999; Zarkesh-Esfahani, H. et al. 2001). De plus, la leptine potentialise l'effet stimulant de l'IFN- γ sur l'expression d'iNOS et de COX2 dans les macrophages (Raso, G.M. et al. 2002). Cette adipokine régule également la fonction des monocytes/macrophages. En effet, les monocytes/macrophages de souris *ob/ob* ou *db/db* présentent une fonction phagocytaire altérée et l'administration de leptine à des souris déficientes pour la leptine restaure cette fonction (Loffreda, S. et al. 1998). La leptine est également capable de stimuler la phagocytose des monocytes/macrophages *via* l'activation de phospholipases (Mancuso, P. et al. 2004) et d'inhiber l'apoptose des monocytes mis en culture sans sérum *via* la voie des MAPK (Najib, S. and Sanchez-Margalet, V. 2002). Une étude effectuée sur des macrophages murins montre que la leptine est un chimio-attractant potentiel pour les monocytes et les macrophages et que cet effet nécessite la présence de la forme longue de son récepteur (Ob-Rb) (Gruen, M.L. et al. 2007). De plus, dans les macrophages murins, la leptine stimule l'expression génique de chimiokines *via* la voie de signalisation JAK2-STAT3 (Kiguchi, N. et al. 2009).

La leptine favorise également le chimiotactisme et la production de radicaux libres oxygénés par les polynucléaires neutrophiles (Caldefie-Chezet, F. et al. 2001; Caldefie-Chezet, F. et al. 2003) et

inhibe leur apoptose (Bruno, A. et al. 2005). Les effets chimio-attractant et anti-apoptotique de la leptine sont médiés conjointement par la voie des MAPK (Bruno, A. et al. 2005). La leptine induit également la survie des polynucléaires neutrophiles par la voie de signalisation PI3K (Bruno, A. et al. 2005).

Les DC sont activées par la leptine. En effet, elle stimule la production d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IL-12 par les DC matures et immatures alors que la sécrétion de TNF- α est augmentée uniquement dans les DC immatures (Mattioli, B. et al. 2005). Les DC, quel que soit leur état de maturité, traitées avec la leptine orientent les LT naïfs vers une polarisation de type Th1 et ont une capacité à stimuler les LT plus importante que les DC non traitées (Mattioli, B. et al. 2005; Mattioli, B. et al. 2008). La leptine accroît également la survie des DC par l'activation de NF- κ B et d'Akt et par la sur-expression du gène Bcl2 (Mattioli, B. et al. 2005; Mattioli, B. et al. 2009). Enfin, la leptine favorise également le chémoattractisme des DC immatures par action directe sur la dynamique du cytosquelette et sur la sur-expression du récepteur de chimiokines CCR7 (Mattioli, B. et al. 2008).

Des souris *ob/ob* présentent une réduction du nombre de cellules B immatures comparé à des souris témoins suggérant que la leptine est nécessaire au développement des LB (Claycombe, K. et al. 2008). Elle stimule notamment la production par les LB d'IL-6, d'IL-10 et de TNF- α *via* les voies de signalisation JAK2/STAT3 et MAPK/ERK1/2 (Agrawal, S. et al. 2011). Ces sécrétions cytokiniques contribuent aux propriétés inflammatoires et immunorégulatrices de la leptine.

Les effets de la leptine sur les LT ont essentiellement été focalisés sur les LT CD4. Contrairement aux monocytes/macrophages, la leptine seule est incapable d'induire la prolifération et l'activation des LT matures humains circulants. Co-administrée avec des immunostimulants non spécifiques, elle provoque l'expression de marqueurs d'activation (CD69, CD25 et CD71) dans les LT CD4 et CD8 (Martin-Romero, C. et al. 2000). De plus, l'addition de concentrations physiologiques de leptine lors d'une réaction lymphocytaire mixte, qui consiste à mettre en présence des LT avec des cellules contenant un CMH incompatible, induit une prolifération dose dépendante des LT CD4 (Lord, G.M. et al. 1998). Toutefois, la leptine présente des effets variés sur la prolifération et la production de cytokines des LT CD4 naïfs (CD45RA⁺) et des LT CD4 mémoires (CD45RA⁻). La leptine, *via* les voies de signalisation MAPK et PI3K, stimule la prolifération et la sécrétion d'IL-2 par les LT CD4 naïfs alors qu'elle exerce de faibles effets sur la prolifération des LT CD4 mémoires (Lord, G.M. et al. 1998; La Cava, A. and Matarese, G. 2004). Elle induit également l'expression de molécules d'adhésion à la surface des LT CD4 telles que ICAM-1 qui favorise l'activation et la migration des LT CD4 vers le site inflammatoire (La Cava, A. and Matarese, G. 2004). Par ailleurs, la leptine induit une polarisation de type Th1 de la réponse immune en favorisant la production d'IFN- γ et de TNF- α par les LT CD4 et la synthèse d'IgG2a par les LB ainsi qu'une activation des macrophages (Lord, G.M. et al. 1998; La Cava, A. and Matarese, G. 2004). A l'inverse, la leptine inhibe les réactions de type Th2

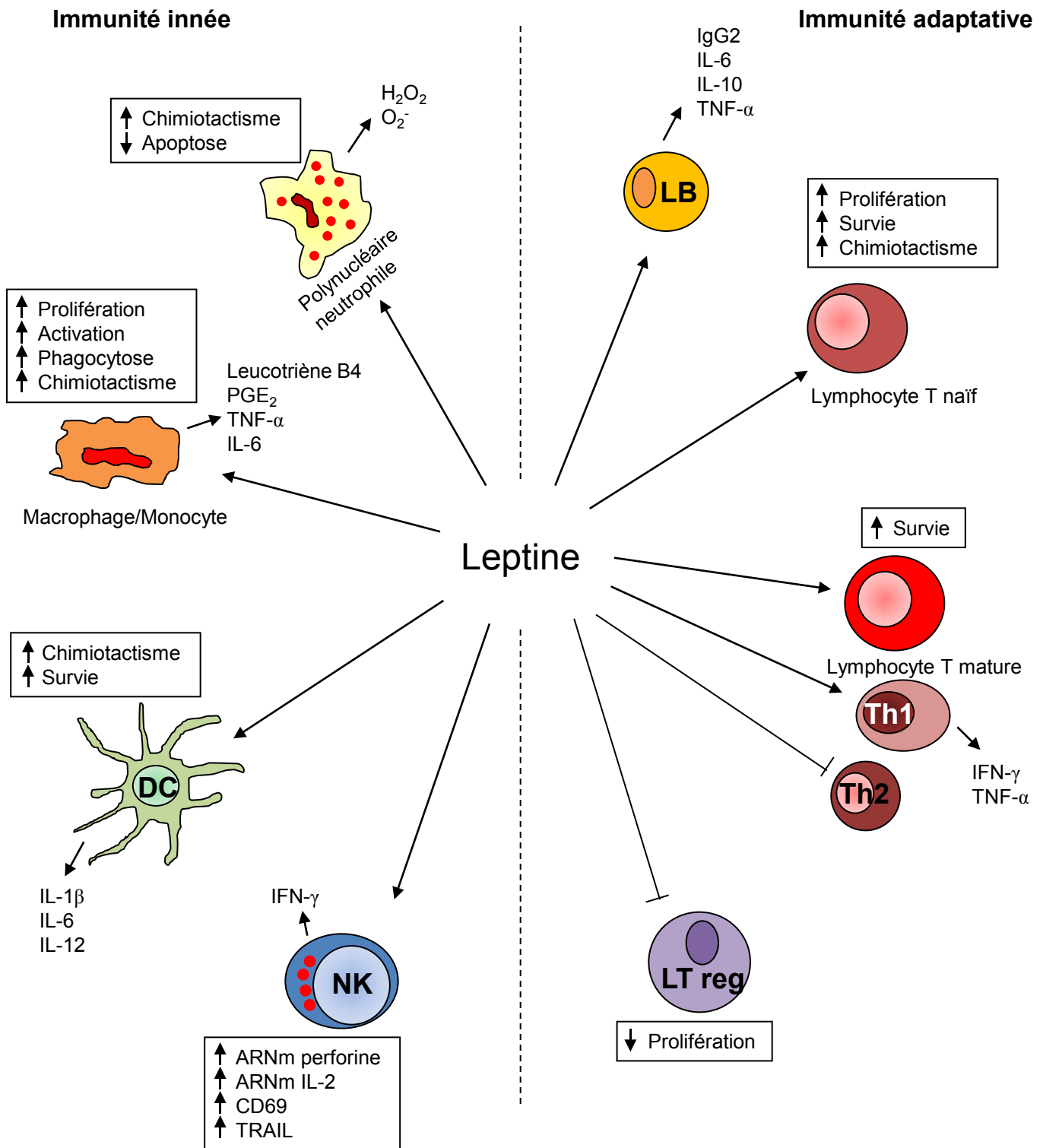


Figure 77 : **Effet de la leptine sur la réponse immune innée et adaptative**

DC : cellule dendritique ; IFN : interféron ; Ig : immunoglobuline ; IL : interleukine ; LB : lymphocyte B ; LT : lymphocyte T ; LT reg : lymphocyte T régulateur ; M1 : macrophage de phénotype M1 ; M2 : macrophage de phénotype M2 ; MDSC : cellule suppresseur dérivée des myéloïdes ; NK : cellule natural killer ; PGE_2 : prostaglandine E_2 ; TNF : tumor necrosis factor

(D'après La Cava, A. and Materese, G. 2004)

en réduisant la production d'IL-4 par les LT CD4 et celle d'IgG1 par les LB (Lord, G.M. et al. 1998; La Cava, A. and Matarese, G. 2004). Elle induirait également un signal de survie dans les LT non matures durant leur maturation (Howard, J.K. et al. 1999). En effet, les souris *ob/ob* présentent une atrophie du thymus affectant le cortex thymique où se trouvent la plupart des thymocytes double positifs CD4⁺ CD8⁺ et l'apport de leptine permet de réduire l'apoptose de ces cellules (Howard, J.K. et al. 1999). La leptine stimule également la survie des LT matures en majorant l'expression de protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-X_L (Fujita, Y. et al. 2002; La Cava, A. and Matarese, G. 2004).

Les LTreg expriment également Ob-R et sont capables de produire de la leptine (De Rosa, V. et al. 2007). Toutefois, la leptine inhibe l'expansion de ces cellules. En effet, *in vitro*, la neutralisation de la leptine avec un anticorps spécifique associé à un anticorps anti-CD3/CD28 pour stimuler les LTreg, induit la prolifération de ces cellules (De Rosa, V. et al. 2007). L'anergie des LTreg en réponse à la leptine passe notamment par les voies de signalisation MAPK/ERK1/2 (De Rosa, V. et al. 2007) et mTOR (Procaccini, C. et al. 2010).

Peu de travaux se sont intéressés à l'impact de la leptine sur les cellules NK. Toutefois, les études sur des souris *ob/ob* (Chandra, R.K. 1980; Kanda, T. et al. 2004) ou *db/db* (Tian, Z. et al. 2002) démontrent une moindre cytotoxicité des cellules NK spléniques comparativement à des souris sauvages. Les souris *db/db* présentent également une moindre expression du marqueur d'activation CD69 à la surface des cellules NK et un nombre réduit de cellules NK dans le foie, la rate, les poumons et le sang (Tian, Z. et al. 2002). Ces données démontrent que la leptine est nécessaire au développement et à l'activation des cellules NK. *In vitro*, la leptine est capable de stimuler la cytotoxicité des lignées humaines de cellules NK telles que YT et NK-92, respectivement indépendante et dépendante de l'IL-2, et elle intensifie la prolifération cellulaire uniquement pour la lignée YT (Zhao, Y. et al. 2003). Cet effet stimulateur de la leptine dans les cellules YT passerait en partie par l'activation de STAT3 et par une sur-expression de l'ARNm de la perforine et de l'IL-2 (Zhao, Y. et al. 2003). Le traitement par la leptine de cellules NK isolées à partir de sang de volontaires sains accroît la cytotoxicité, l'expression de TRAIL, la sécrétion et la production intracellulaire d'IFN- γ (Wrann, C.D. et al. 2012). De plus, ces cellules NK forment davantage de conjugué avec les cellules cibles (K562) et sur-expriment le marqueur d'activation CD69 (Wrann, C.D. et al. 2012).

Toutes ces données suggèrent que la leptine est capable d'activer la majorité des cellules immunitaires (**Figure 77**) et ainsi d'exercer une protection de l'organisme et en particulier vis-à-vis des cellules cancéreuses. Cependant, ces études ont des limites car elles ne reflètent pas une imprégnation leptinique au long cours comme observée en situation d'obésité (Gomez, J.M. et al. 2003; Mahabir, S. et al. 2007). En effet, une hyperleptinémie chronique est associée à un risque élevé

Tableau 6 : **Impact de l'obésité sur la fonctionnalité des cellules immunes**

Type de cellule immune	Impact de l'obésité
Homme	
LT CD8	↓ Nombre
	↓ Prolifération en réponse à une stimulation
LT CD4	↓ ou ↑ Nombre
LB	↓ Prolifération en réponse à une stimulation
NK	↓ Nombre
	↓ Cytotoxicité
Rongeur	
LT	↓ Nombre
	↓ Prolifération en réponse à une stimulation
NK	↓ Nombre
	↓ Cytotoxicité

Abréviations: LB, lymphocyte B; LT, lymphocyte T, NK, natural killer.

(D'après Karlsson, E.A. and Beck, M.A. 2010)

de développer différents types de cancer en particulier le cancer du sein (Wu, M.H. et al. 2009). De plus, l'obésité entraînerait une inhibition de la fonctionnalité des cellules immunes (Marti, A. et al. 2001; Karlsson, E.A. and Beck, M.A. 2010). En effet, une leptino-résistance est observée au niveau du système nerveux central (Badman, M.K. and Flier, J.S. 2007; Tschop, J. et al. 2010), l'hypothèse selon laquelle les cellules immunitaires pourraient également devenir résistantes à la leptine a été émise pour expliquer cette immunodéficience (Karlsson, E.A. and Beck, M.A. 2010). Des études réalisées notamment sur les cellules NK viennent étayer cette hypothèse. En effet, les cellules NK de volontaires sains cultivées en présence de fortes concentrations de leptine durant plus de 4 jours, prolifèrent mais, présentent une activité lytique et sécrétoire (IFN- γ) réduite (Wrann, C.D. et al. 2012). L'injection de leptine à des rats rendus obèses suite à un régime hypercalorique et à des rats de poids normal provoque une inhibition des cellules NK quatre fois inférieure dans le groupe obèse comparativement au groupe témoin (Nave, H. et al. 2008). Cet effet serait en partie dû à une moindre stimulation par la leptine de JAK2 dans les cellules NK des rats obèses (Nave, H. et al. 2008). Ainsi, une hyperleptinémie prolongée induit une résistance à la leptine par une désensibilisation de la voie JAK/STAT qui engendrerait une réduction de l'activation des cellules NK (Nave, H. et al. 2008).

III) Impact du stress métabolique dans la cancérogenèse et la vigilance anti-tumorale

Plusieurs études épidémiologiques démontrent un lien entre obésité et divers types de cancer (colon, prostate, endomètre et sein) (Renehan, A.G. et al. 2008). L'obésité module à la fois le développement tumoral (Hursting, S.D. and Berger, N.A. 2010; Roberts, D.L. et al. 2010) et le système immunitaire (Marti, A. et al. 2001; Karlsson, E.A. and Beck, M.A. 2010). En effet, l'obésité chez l'homme et l'animal est associée à une certaine immunodéficience (Marti, A. et al. 2001) (**Tableau 6**). Une diminution du nombre de LT CD8 et une réduction ou une augmentation du nombre de LT CD4 ont été rapportées (O'Rourke, R.W. et al. 2005) (**Tableau 6**). Les LT et les LB prolifèrent moins en réponse à une stimulation (Lamas, O. et al. 2002). Non seulement le nombre mais, aussi l'activité lytique des cellules NK sont réduits (Scanga, C.B. et al. 1998; Lynch, L.A. et al. 2009; O'Shea, D. et al. 2010). Toutefois, il est intéressant de noter que la population de cellules NK dans le sang est supérieure chez des obèses qui ne présentent pas de syndrome métabolique comparativement à ceux ayant développé un syndrome métabolique. Dans le premier cas, les cellules NK expriment d'avantage de marqueurs d'activation (CD69) et moins de récepteurs inhibiteurs (Lynch, L.A. et al. 2009).

Au travers des études cliniques, le principal problème dans la compréhension des effets de l'obésité sur la réponse immunitaire est que les populations étudiées sont très hétérogènes notamment en termes d'habitudes alimentaires et d'environnement social. Aussi, l'utilisation de modèles animaux a permis d'explorer l'impact de l'obésité sur les cellules immunes en s'affranchissant de cette

hétérogénéité (Lamas, O. et al. 2002). Ainsi, des souris *ob/ob* ou *db/db* sont d'excellents modèles pour observer les effets d'une obésité extrême. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, la leptine est capable de moduler les cellules du système immunitaire (Karlsson, E.A. and Beck, M.A. 2010) et, l'obésité consécutive à des mutations du gène de la leptine ou de son récepteur est un phénotype extrêmement rare chez l'homme (Carlsson, B. et al. 1997). Par conséquent, l'utilisation d'une alimentation hypercalorique favorisant la prise de poids et donc l'obésité semble plus adaptée pour évaluer l'impact d'une sur-alimentation chronique sur les cellules immunes. Comme chez l'homme, ces animaux présentent une altération de la réponse immunitaire (**Tableau 6**). En effet, un régime hypercalorique chez le rat ou la souris provoque une diminution du nombre et de la prolifération des LT au niveau de la rate (Lamas, O. et al. 2002; Sato Mito, N. et al. 2009) (**Tableau 6**). Il est également observé chez ces animaux une réduction du nombre et de la cytotoxicité des cellules NK (Smith, A.G. et al. 2007; Nave, H. et al. 2008; Lautenbach, A. et al. 2009). Par ailleurs, les cellules NK prélevées chez des rats rendus obèses, en réponse à un régime hypercalorique, puis transférées chez des rats de poids normal tendent à retrouver un phénotype identique à celui de cellules NK d'animaux de poids normal (Lautenbach, A. et al. 2009). Ces données suggèrent l'implication de facteurs sécrétés par les adipocytes en situation d'obésité dans l'inhibition des cellules NK (Lautenbach, A. et al. 2009).

Différentes hypothèses, telles que l'augmentation du taux circulant de l'« insulin growth factor-1 » (IGF-1), des œstrogènes et de certaines adipokines, ont été proposées pour expliquer l'association entre obésité, risque de cancer et immunodéficience. L'effet de la leptine ayant déjà été détaillé précédemment seules les deux autres hypothèses seront abordées. Parmi les nutriments favorisant la prise de poids voire l'obésité, il y a les acides gras. Ces derniers modulent également le développement tumoral et la réponse immune anti-tumorale.

III-1 Les acides gras

III-1-1 Les acides gras et la cancérogenèse

L'obésité est caractérisée par une élévation permanente du taux d'acides gras libres plasmatiques (Calle, E.E. and Kaaks, R. 2004). Outre le fait qu'ils constituent une importante source énergétique de l'organisme (McArthur, M.J. et al. 1999), ils peuvent se lier aux « peroxisomal proliferated-activated receptors » (PPAR) nucléaires et induire la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides et du glucose (Ferre, P. 2004).

Le poids relatif des facteurs alimentaires dans le déterminisme des cancers est très important puisque ceux-ci pourraient contribuer pour 30 à 40% des cancers chez les hommes et 60% des cancers chez les femmes (Willett, W.C. 1995). Parmi les nutriments incriminés, il y a les acides gras qui

lorsqu'ils sont consommés en excès favorisent le développement néoplasique dans différents types de cancer tels que le cancer du sein, du colon, de la prostate et des ovaires (Gerber, M. 2009). Toutefois, leurs effets sur la pathologie cancéreuse diffèrent selon le type d'acides gras (Gerber, M. 2009). En effet, un apport excessif d'acides gras saturés est un facteur de risque de développer un cancer du colon ou du sein, à l'inverse la consommation mixte d'acides gras saturés et mono-insaturés est associée à un moindre risque (Thiebaut, A.C. and Clavel-Chapelon, F. 2001; Wakai, K. et al. 2006; Gerber, M. 2009). Au niveau expérimental, chez des souris porteuses de tumeurs coliques (CT26) ou mammaires (4T1 ou E0771), un régime majoritairement constitué d'acides gras saturés et mono-insaturés (lard) stimule le développement tumoral (Gu, J.W. et al. 2011; Kim, E.J. et al. 2011; Park, H. et al. 2011). Dans les pays méditerranéens, où la principale source d'acides gras mono-insaturés est l'huile d'olive et non les graisses animales, ces acides gras sont associés à une diminution du risque de cancer du colon et du sein (Rouillier, P. et al. 2005; Bessaoud, F. et al. 2008).

Les études épidémiologiques révèlent que les acides gras polyinsaturés n-3 (ou oméga 3) diminuent le risque de cancer alors que les acides gras polyinsaturés n-6 (ou oméga 6) n'influenceraient pas le développement tumoral (Wakai, K. et al. 2006; Thiebaut, A.C. et al. 2009). Dans l'alimentation moderne, dite « Western diet », le déséquilibre du rapport n-6/n-3, conséquence d'une sur-consommation d'acides gras polyinsaturés n-6 au détriment des acides gras polyinsaturés n-3, est un facteur de risque de cancer (Simopoulos, A.P. 2002; 2006). En contradiction avec les données épidémiologiques, les études sur des modèles animaux montrent que les acides gras polyinsaturés n-6 sont capables de stimuler le développement tumoral (Fay, M.P. et al. 1997; Funahashi, H. et al. 2008). En effet, un régime enrichi en acides gras polyinsaturés n-6 stimule la prolifération tumorale et la formation de métastases chez les souris « nudes » ayant reçu une injection de cellules cancéreuses mammaires humaines (MDA-MB-435, MDA-MB-231) (Rose, D.P. et al. 1994). A l'inverse, dans ce même modèle expérimental, la prolifération et l'invasion métastatique des cellules cancéreuses mammaires humaines MDA-MB-435, MDA-MB-231 et MCF-7 sont réduites sous un régime riche en acides gras polyinsaturés n-3 (Rose, D.P. et al. 1995; Connolly, J.M. et al. 1999; Kang, K.S. et al. 2010).

Les études *in vitro* ont permis d'explorer les mécanismes mis en jeu par les acides gras pour moduler le développement tumoral. Les récepteurs couplés aux protéines G40 et G120 (GPR40 et 120) sont capables de fixer les acides gras libres à longue et moyenne chaînes (Briscoe, C.P. et al. 2003; Hirasawa, A. et al. 2005). Ils sont exprimés dans différentes lignées de cellules cancéreuses mammaires (Yonezawa, T. et al. 2004; Navarro-Tito, N. et al. 2008). Les effets de l'oléate et du palmitate, respectivement mono-insaturé et saturé, ont été testés sur des lignées de cellules cancéreuses mammaires. Dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231, l'oléate mais, pas le palmitate peut se lier au GPR40 et induire une augmentation des concentrations calciques intracellulaires impliquées dans la

signalisation cellulaire (Yonezawa, T. et al. 2004; Hardy, S. et al. 2005). De plus, l'oléate stimule la prolifération des cellules négatives pour le récepteur des œstrogènes tels que les cellules MDA-MB-231 et des cellules positives pour ce récepteur comme ZR-75-1 et MCF-7 alors que la palmitate exerce un effet inhibiteur (Hardy, S. et al. 2000). Même si le récepteur GPR40 est également retrouvé dans les cellules épithéliales mammaires non tumorales MCF-10A, la prolifération de ces cellules n'est pas modulée par l'oléate, suggérant que l'action de cet acide gras serait restreinte aux cellules cancéreuses (Soto-Guzman, A. et al. 2008). Dans les cellules MDA-MB-231, ces effets seraient notamment dûs à une stimulation par l'oléate ou une réduction par le palmitate de l'activité de la PI3K (Hardy, S. et al. 2000). De plus, après fixation sur le GPR40, l'oléate induit également la prolifération de ces cellules par l'activation d'Akt, des « mitogenic-extracellular signal regulated kinase 1/2 » (MEK 1/2), de la PKC et d'ERK 1/2 (Hardy, S. et al. 2005; Soto-Guzman, A. et al. 2008). Par ailleurs, l'oléate exerce un effet anti-apoptotique sur les cellules MDA-MB-231 et est capable d'inhiber l'effet pro-apoptotique du palmitate sur ces cellules (Hardy, S. et al. 2000). L'oléate stimule aussi la production de MMP-9 et provoque la phosphorylation de la « focal adhesion kinase » (FAK) dans les cellules MDA-MB-231 (Soto-Guzman, A. et al. 2010). Cette enzyme est impliquée dans différents processus cellulaires tels que l'adhésion, la migration, la survie et la prolifération (Hanks, S.K. et al. 2003). L'oléate favorise, ainsi, la formation et l'invasion métastatique des cellules MDA-MB-231 (Soto-Guzman, A. et al. 2010). Dans les cellules MCF-7, l'augmentation de la prolifération induite par l'oléate est dépendante de l'activation d'ERK1/2 et des MMP *via* le récepteur GRP40 (Soto-Guzman, A. et al. 2008).

L'impact d'un acide gras polyinsaturé de la série n-6, l'acide arachidonique, sur les cellules cancéreuses mammaires a également été exploré. Cet acide gras induit l'activation de la FAK dans les cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231, ZR-75 et MCF-7 mais, pas dans les cellules non cancéreuses MCF-10A. Ainsi, l'acide arachidonique stimule la migration et la production d'eicosanoïdes des cellules MDA-MB-231 *via* le GPR40 (Navarro-Tito, N. et al. 2008). De plus, suite à l'activation de la voie de signalisation mTOR, cet acide gras stimule la prolifération, l'expression de HIF-1 α et la sécrétion du VEGF par les cellules MCF-7 suggérant que l'acide arachidonique participerait *in vivo* à l'angiogenèse tumorale (Wen, Z.H. et al. 2012). A l'inverse, l'acide docosahexaénoïque, un acide gras polyinsaturé de type n-3, diminue la viabilité des lignées de cellules cancéreuses mammaires MDA-MB-231, MDA-MB-435 et MCF-7 (Kang, K.S. et al. 2010). Dans cette dernière lignée, il induit l'accumulation de ROS qui activent les caspases provoquant l'apoptose des cellules (Kang, K.S. et al. 2010). L'acide docosahexaénoïque est également à l'origine d'une sous-expression du récepteur des œstrogènes α dans les cellules MCF-7 (Lu, I.F. et al. 2010). De plus, la phosphorylation de MAPK et la production de cycline D1 stimulées par les œstrogènes suite à leur fixation sur leur récepteur α , sont réprimées en présence de cet acide gras. Cela suggère que l'acide

docosahexaénoïque pourrait également réduire la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 en inhibant la signalisation des œstrogènes (Lu, I.F. et al. 2010).

III-1-2 Les acides gras et la réponse immune

Outre leurs effets sur le développement tumoral, les acides gras peuvent également moduler la réponse immune. En effet, des études cliniques et expérimentales montrent qu'un apport élevé d'acides gras polyinsaturés n-3 ou l'inclusion d'émulsion lipidique d'acides gras polyinsaturés n-3 ou mono-insaturés dans un régime administré par voie parentérale, diminue la prolifération des lymphocytes (Granato, D. et al. 2000; Moussa, M. et al. 2000). Toutefois, même si les acides gras mono-insaturés tel que l'oléate réprime la prolifération des LT, leurs impacts sont inférieurs à ceux observés avec les acides gras polyinsaturés n-3 (Calder, P.C. 1995). L'effet inhibiteur des acides gras polyinsaturés n-3 pourrait passer par une diminution de l'expression de la sous-unité α du récepteur de l'IL-2 à la surface des LT (Soyland, E. et al. 1994). Les acides gras insaturés sont également capables d'inhiber la fonction cytotoxique des LT CD8 alors que les saturés n'ont aucun effet (Stulnig, T.M. et al. 2000; Kleinfeld, A.M. and Okada, C. 2005). Cette différence d'effets entre les acides gras saturés et insaturés sur les cellules immunes est dépendante de leur incorporation au sein des membranes cellulaires (Anel, A. et al. 1993). Cet aspect sera détaillé ultérieurement. L'acide arachidonique (n-6) et docosahexaénoïque (n-3) altèrent également l'expression du CMH de classe I à la surface des lymphoblastes, ce qui inhibe la formation de la synapse immunologique avec les LT CD8 et réduit ainsi la cytotoxicité de ces cellules vis-à-vis des cellules tumorales lymphoblastiques (Shaikh, S.R. and Edidin, M. 2007). De plus, les cellules tumorales mammaires sécrètent des acides gras insaturés capables d'inhiber l'activité des LT CD8 (Kleinfeld, A.M. and Okada, C. 2005).

Les acides gras peuvent aussi moduler différemment la réponse de type Th1 ou Th2 des LT CD4. Alors que les acides gras saturés influencent peu la sécrétion cytokinique des LT CD4, les acides gras polyinsaturés inhibent la production de cytokines de type Th1 sans altérer celle de type Th2 (Wallace, F.A. et al. 2001). Les acides gras polyinsaturés n-3 et n-6 semblent avoir un effet similaire sur la réponse Th1/Th2 (Wallace, F.A. et al. 2001). Toutefois, la capacité à orienter les LT CD4 vers une réponse de type Th2 est plus importante pour les acides gras polyinsaturés n-3 (Wallace, F.A. et al. 2001). La consommation d'acides gras polyinsaturés n-3 réduit, également, la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 et TNF- α par les LT et les macrophages (Meydani, S.N. et al. 1991). De nombreuses études rapportent des effets contradictoires des acides gras sur la production des cytokines pro-inflammatoires (Endres, S. 1996; de Pablo, M.A. et al. 1998). Différents facteurs, tels que la durée de l'alimentation et l'espèce animale, sont incriminés (Lokesh, B.R. et al. 1990; Tappia, P.S. and Grimble, R.F. 1994). Par exemple, une alimentation enrichie en huile de poisson (riche en acide docosahexaénoïque et eicosapentaénoïque n-3) et en huile d'olive (contenant

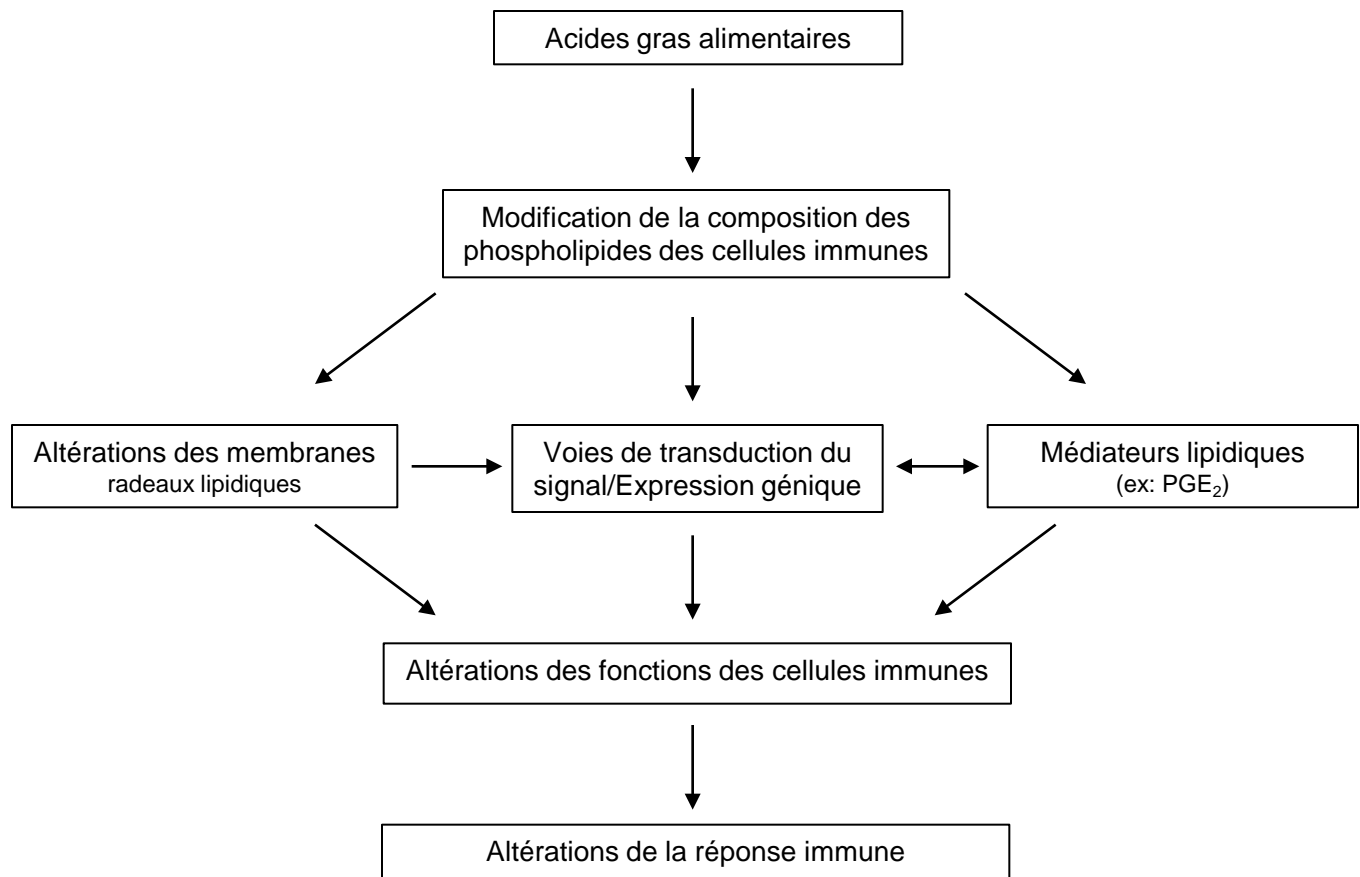


Figure 78 : **Mécanismes d'action des acides gras alimentaires sur la réponse immune**
(D'après Calder, P.C. 2007)

majoritairement de l'acide oléique) administrée à des rats durant 4 semaines, inhibe la production d'IL-1 alors qu'un apport enrichi spécifiquement en huile d'olive sur une durée de 8 semaines stimule la production d'IL-1 (Tappia, P.S. and Grimble, R.F. 1994).

La fonction des macrophages peut également être modulée par les acides gras. La phagocytose des macrophages péritonéaux de souris soumises à un régime enrichi en huile d'olive (de Pablo, M.A. et al. 1998) ou en acide gras polyinsaturés n-3 tels que l'acide eicosapentaénoïque ou docosahexaénoïque (Calder, P.C. et al. 1990) est stimulée. Dans les monocytes, les acides gras polyinsaturés n-3 sont associés à une réduction de l'action des ROS (Fisher, M. et al. 1990). De plus, alors qu'une supplémentation à long terme avec des acides gras polyinsaturés n-3 inhibe le chimiotactisme des monocytes (Schmidt, E.B. et al. 1992), à court terme elle n'a aucun effet (Schmidt, E.B. et al. 1996). Par ailleurs, en présence d'acides gras polyinsaturés n-3, la capacité des CPA à présenter l'antigène *via* le CMH de classe II est réduite (Weatherill, A.R. et al. 2005). Cela est confirmé *in vivo* par différentes études (Hughes, D.A. et al. 1996; Sanderson, P. et al. 1997) dont celle de Sanderson et al. montrant que des rats nourris avec un régime riche en huile de poisson présentent une diminution de l'expression du CMH de classe II à la surface des DC (Sanderson, P. et al. 1997). De plus, ces dernières perdent leur capacité à présenter l'antigène aux LT spléniques (Sanderson, P. et al. 1997).

En ce qui concerne les cellules NK, les études chez l'animal décrivent que les régimes à base d'huile de poisson ou d'huile d'olive inhibent l'activité cytotoxique comparativement aux régimes riches en acides gras saturés ou polyinsaturés n-6 (Yaqoob, P. et al. 1994; Jeffery, N.M. et al. 1997). *In vitro*, l'ajout d'acide γ -linoléique (acide gras polyinsaturé n-6, précurseur de l'acide arachidonique), d'eicosapentaénoïque ou de docosahexaénoïque inhibe également l'activité lytique des cellules NK (Yamashita, N. et al. 1991; Purasiri, P. et al. 1997). Peu de travaux concernent l'impact d'une alimentation enrichie en acides gras sur la fonctionnalité des cellules NK humaines. Il a été rapporté qu'une alimentation riche en huile de poisson réduit la cytotoxicité (Thies, F. et al. 2001) et le nombre de cellules NK circulantes (Mukaro, V.R. et al. 2008) alors qu'un régime à base d'huile d'olive ne module pas l'activité de ces cellules (Yaqoob, P. et al. 1998). A l'inverse, une alimentation contenant de l'acide docosahexaénoïque n'altère pas la cytotoxicité des cellules NK (Thies, F. et al. 2001). Ainsi il apparaît que parmi les acides gras polyinsaturés, seul l'acide eicosapentaénoïque retrouvé dans l'huile de poisson induirait la réduction de l'activité cytotoxique des cellules NK (Thies, F. et al. 2001). Une autre étude révèle qu'un régime riche en acide docosahexaénoïque inhibe également la cytotoxicité des cellules NK circulantes (Kelley, D.S. et al. 1999).

Les acides gras modulent la réponse immunitaire par différents mécanismes (**Figure 78**). Quinze à 20% des phospholipides sont retrouvés dans les membranes des cellules immunes (Calder, P.C. et al. 1994; Calder, P.C. 2007). Un régime alimentaire riche en lipides modifie la composition

lipidiques des membranaires des cellules immunes (Calder, P.C. et al. 1994; Peterson, L.D. et al. 1998). Ainsi, un régime riche en acide gras polyinsaturés est capable d'améliorer la fluidité membranaire des lymphocytes T au niveau des radeaux lipidiques agissant ainsi sur l'activité des protéines membranaires (Fan, Y.Y. et al. 2003). En effet, les radeaux lipidiques contiennent de nombreuses protéines impliquées dans la signalisation et ils facilitent les interactions entre elles (Simons, K. and Toomre, D. 2000; Katagiri, Y.U. et al. 2001). Des cellules Jurkat (LT) mises en culture avec de l'acide eicosapentaénoïque présentent une inhibition de la phosphorylation des molécules de signalisation « linker of activated T cells » (LAT) du fait d'un déplacement réduit des LAT au sein des radeaux lipidiques (Zeyda, M. et al. 2002). L'absence de phosphorylation des LAT est un des mécanismes par lesquels les acides gras polyinsaturés n-3 inhibent la réponse des LT *in vitro* (Zeyda, M. et al. 2002). Les études chez le rongeur révèlent également qu'un régime riche en huile de poisson affecte les étapes précoces de signalisation des LT telle que la phosphorylation de la phospholipase C- γ (Sanderson, P. and Calder, P.C. 1998). Cela se traduit par des modifications fonctionnelles comme une diminution de la prolifération et de la production d'IL-2 (Fan, Y.Y. et al. 2004).

Les acides gras peuvent également moduler directement la signalisation intracellulaire. La reconnaissance du complexe CMH/peptide par le TCR des LT induit l'activation *via* le CD3 de plusieurs voies de signalisation dont la voie calcique (Negulescu, P.A. et al. 1994), la voie de la PKC (Monks, C.R. et al. 1997) et la voie des MAPK (Gupta, S. et al. 1994) (**Figure 3**). Chez la souris, un régime à base d'huile de graines de lin (riche en acides gras polyinsaturés n-3) inhibe l'entrée du calcium dans les LT en réponse à une stimulation alors qu'un régime à base d'huile d'olive (contenant majoritairement de l'acide oléique) l'augmente (Peck, M.D. et al. 2000). De plus, contrairement à l'acide arachidonique, les acides eicosapentaénoïque et docosahexaénoïque abolissent, dans les cellules Jurkat, l'activation des MAPK en réponse à une stimulation par le PMA ou un anticorps anti-CD3 (Denys, A. et al. 2001). Ces acides gras modulent l'activation des MAPK en partie *via* des effets inhibiteurs sur la PKC (Denys, A. et al. 2001). Toutefois, les mécanismes par lesquels ils inhibent la PKC sont mal connus. Par ailleurs, l'acide eicosapentaénoïque réduit également la phosphorylation des MAPK dans les macrophages stimulés par du lipopolysaccharide (Lo, C.J. et al. 2000). Cette inhibition décroît la réponse inflammatoire des macrophages et suggère que l'effet de l'acide eicosapentaénoïque sur l'inflammation passerait par la modulation de l'activité des MAPK (Lo, C.J. et al. 2000).

Les acides gras polyinsaturés n-3 possèdent des propriétés anti-inflammatoires alors que les acides gras polyinsaturés n-6 sont des précurseurs des voies pro-inflammatoires (Calder, P.C. 2006). Il existe plusieurs mécanismes d'action de cette modulation inflammatoire :

- la modification de la fluidité membranaire des lymphocytes T agissant sur l'activité des protéines membranaires ;
- la compétition entre acides gras polyinsaturés n-3 et n-6 comme substrats enzymatiques abaissant la quantité de molécules pro-inflammatoires telles que les PGE2 et les LTB4;
- une action directe au niveau des récepteurs nucléaires PPAR α et γ en agissant comme rétrocontrôle sur le facteur NF κ -B.

Les acides gras à longue chaîne tels que le docosahexaénoïque, l'acide linoléique, l'acide linolénique et l'acide arachidonique sont des agonistes naturels des récepteurs nucléaires PPAR- α . Au plus la chaîne carbonée est longue, au plus l'activation de PPAR- α est forte. Les dérivés oxydés des lipides (LTB4, 8-S-HETE, 15-désoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J₂...) issus des voies des cyclo-oxygénases et des voies des lipo-oxygénases sont également des activateurs des récepteurs PPAR- α (Moraes, L.A. et al. 2006). Ces derniers peuvent aussi être activés par des ligands synthétiques dont les agents pharmacologiques hypolipémiants de la famille des fibrates utilisés en clinique pour diminuer le taux des triglycérides et accroître celui du cholestérol LDL (Kliwer, S.A. et al. 1997; Murakami, K. et al. 1999).

La 15-désoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J₂ est communément décrite comme un ligand « naturel » mais, sa présence dans les cellules immunes en quantité suffisante pour activer PPAR γ n'a jamais été démontrée et sa spécificité est remise en cause (Straus, D.S. et al. 2000; Thieringer, R. et al. 2000). Des ligands synthétiques de PPAR α et de PPAR γ inhibent la production de cytokines pro-inflammatoires par les monocytes (Jiang, C. et al. 1998). Des souris déficientes pour PPAR α présentent une réponse inflammatoire élevée (Devchand, P.R. et al. 1996), suggérant que ces récepteurs exercent un rôle anti-inflammatoire. De plus, les ligands de PPAR γ mais, pas de PPAR α sont capables de réduire les capacités de présentation de l'antigène des monocytes en inhibant l'expression de molécules de CMH de classe II à leur surface (Kwak, B.R. et al. 2002). Les PPARs peuvent également réguler la fonction des LT. Le récepteur PPAR α est l'isoforme majoritaire dans les LT et les LB alors que l'isoforme PPAR γ prédomine dans les cellules myéloïdes (Jones, D.C. et al. 2002). Après activation des LT, l'expression de PPAR α diminue alors que celle de PPAR γ augmente (Jones, D.C. et al. 2002). De plus, l'ARNm de PPAR γ est davantage exprimé dans les cellules de type Th2 que celles de type Th1 (Chtanova, T. et al. 2001). Les ligands de PPAR γ provoquent une diminution de la production d'IFN- γ et d'IL-2 par les splénocytes (Cunard, R. et al. 2002), inhibent la prolifération des LT humains (Clark, R.B. et al. 2000) et stimulent l'apoptose des LT CD4 murins (Harris, S.G. and Phipps, R.P. 2001).

Les acides gras polyinsaturés modulent également la réponse immune par la production de médiateurs lipidiques tel que la PGE2. L'acide arachidonique, acide gras de la série n-6, présent au

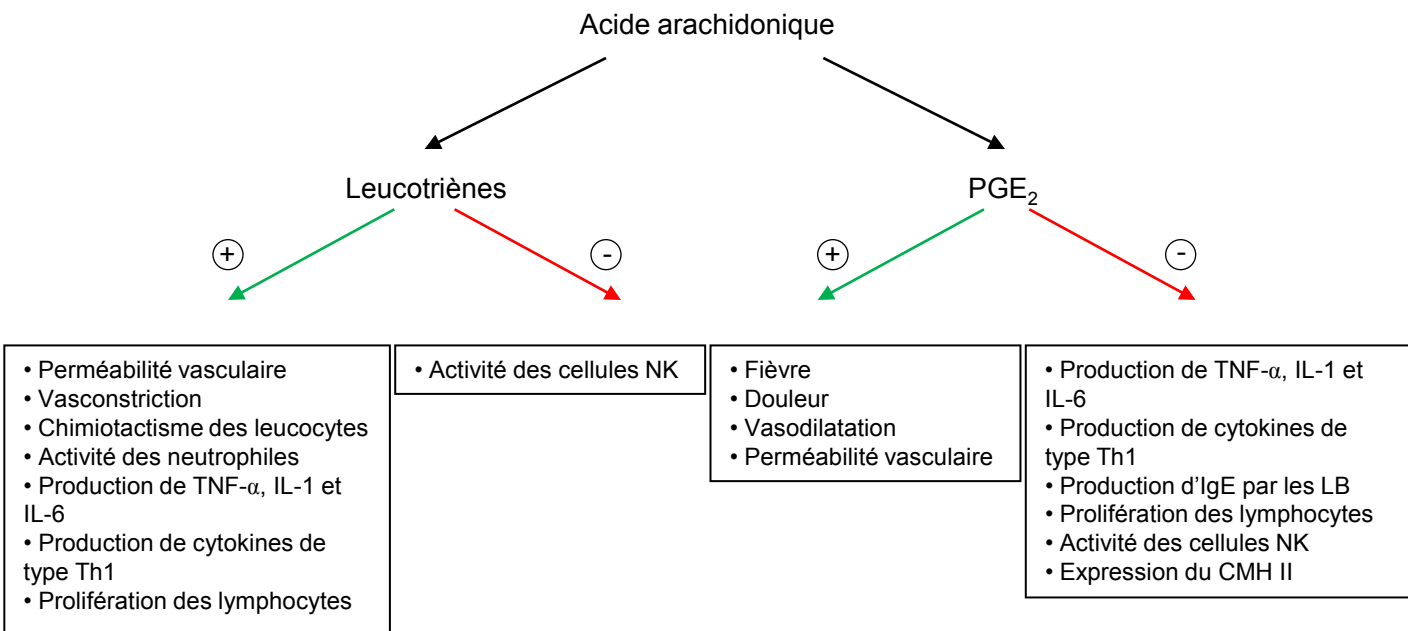


Figure 79 : **Rôles des principaux eicosanoïdes dans la régulation de l'inflammation et de l'immunité**
(D'après Calder, P.C. 2007)

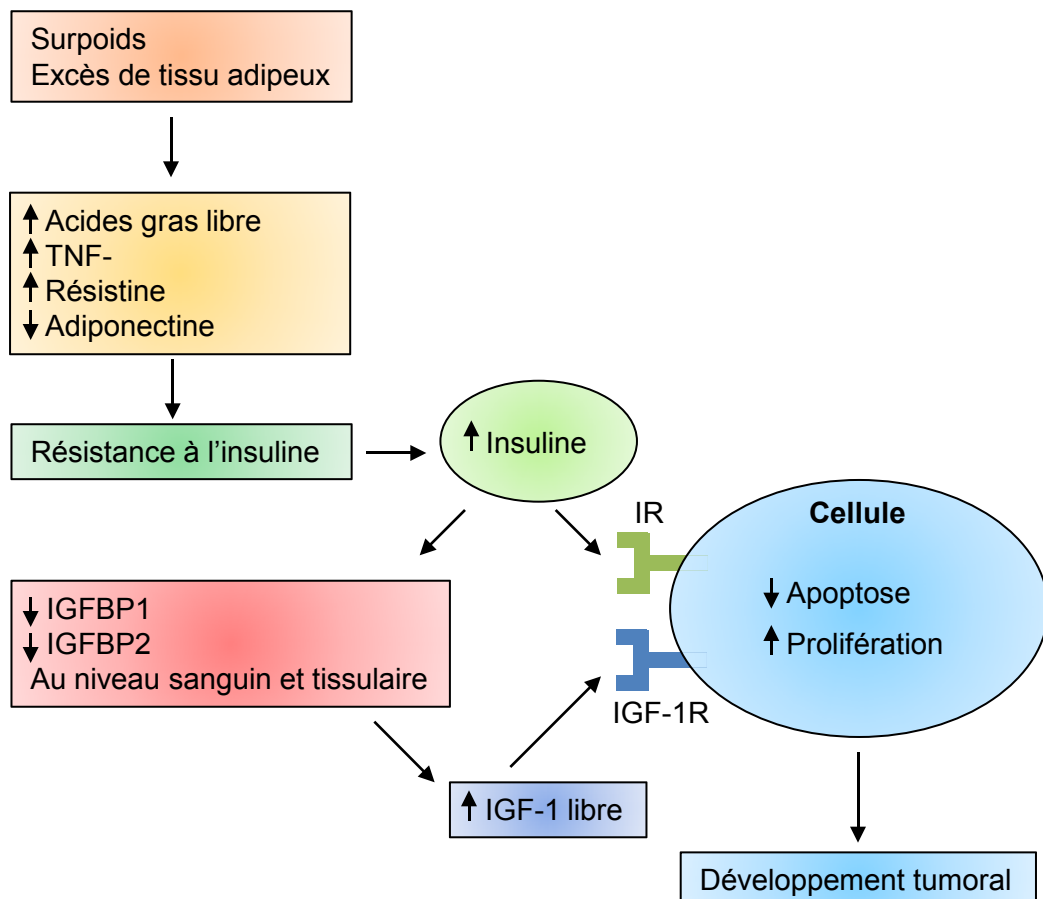


Figure 80 : **Effet de l'obésité sur la production d'IGF-1**
(D'après Calle, E.E. and Kaaks, R. 2004)

sein des membranes de la plupart des cellules immunes, est le principal précurseur de la synthèse des éicosanoïdes dont les leucotriènes et les prostaglandines (Calder, P.C. 2007). Dans des modèles animaux, une relation directe entre la teneur en acide arachidonique au sein des phospholipides membranaires des cellules immunes et leur capacité à produire la PGE2 a été démontré (Peterson, L.D. et al. 1998). Un régime riche en acide arachidonique stimule la production de PGE2 (Peterson, L.D. et al. 1998) alors qu'un régime riche en acide gras eicosapentaénoïque ou docosahexaénoïque la diminue (Chapkin, R.S. et al. 1991; Yaqoob, P. and Calder, P. 1995; Peterson, L.D. et al. 1998). Les éicosanoïdes jouent un rôle important dans la réponse immune (Calder, P.C. 2007) et leurs principaux effets sont résumés dans la **Figure 79**.

III-2 L'insuline like growth factor-1

III-2-1 L'insuline like growth factor-1 et le cancer

Le système « insuline like growth factor » (IGF) englobe l'insuline, l'IGF-1, l'IGF-2 ainsi que leurs récepteurs respectifs (IR, IGF-1R et IGF-2R), les « IGF-binding proteins » (IGFBP) et les IGFBP protéases (Kooijman, R. 2006). Si le foie est la principale source d'IGF-1 (Bonefeld, K. and Moller, S. 2010) le tissu adipeux est également capable de sécréter ce facteur de croissance (Hausman, D.B. et al. 2001). L'IGF-1 agit de façon endocrine, paracrine et autocrine (Kooijman, R. 2006). *In vitro*, il induit la prolifération et inhibe l'apoptose de nombreuses cellules tumorales (LeRoith, D. et al. 1995). Des données épidémiologiques suggèrent qu'un taux plasmatique d'IGF-1 élevé est associé à un risque accru et/ou à un mauvais pronostic pour de nombreux cancers dont celui du sein en post ou pré-ménopause (Hankinson, S.E. et al. 1998; Renehan, A.G. et al. 2006). Il n'y a pas de relation linéaire entre l'indice de masse corporelle (IMC) et le taux circulant d'IGF-1. En effet, un taux maximal d'IGF-1 est observé chez des personnes ayant un IMC compris entre 24 et 27 kg/m² (Holmes, M.D. et al. 2002; Allen, N.E. et al. 2003). L'hypothèse émise pour expliquer ce phénomène serait que les personnes obèses présentent une réduction de certaines IGFBP liant l'IGF-1. Ainsi, le fort taux résultant d'IGF-1 libre serait responsable d'une diminution de la sécrétion de l'hormone de croissance par un mécanisme de rétrocontrôle négatif. Toutefois, au cours de l'obésité, en réponse à l'excès d'acides gras libres, l'organisme répond par une hyperinsulinémie qui stimule la synthèse et l'activité biologique d'IGF-1 (Calle, E.E. and Kaaks, R. 2004) (**Figure 80**). Les études sur les modèles murins montrent que les effets bénéfiques d'une restriction calorique sur le développement tumoral sont associés à la réduction du taux de facteurs de croissance tel que celui de l'IGF-1 (Hursting, S.D. et al. 2003). A l'inverse, une alimentation dite « obésogène » du type hypercalorique provoque une résistance à l'insuline associée à une élévation du taux d'IGF-1 et à une réduction de celui de l'IGFBP-1. La stimulation de la voie de signalisation d'IGF-1 participerait à la cancérogenèse mammaire (Moore, T. et al. 2008a). L'effet anti-cancéreux d'un régime hypocalorique est aboli chez

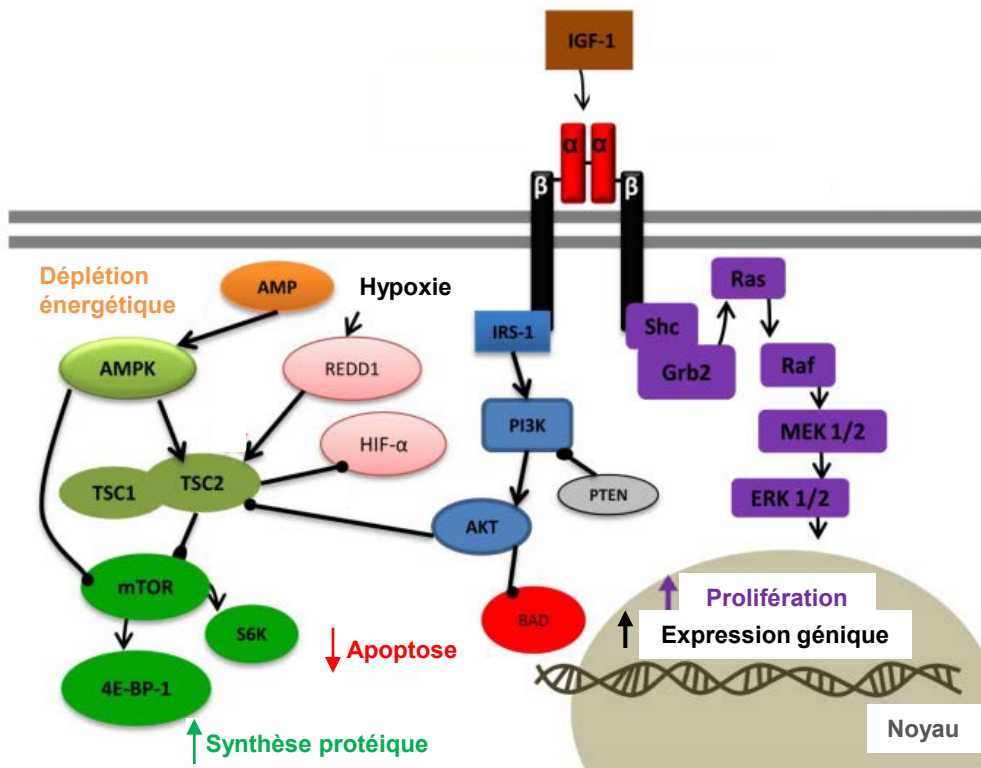


Figure 81 : Voies de signalisation de l'IGF-1R
(D'après Braun, S. et al. 2011)

les souris placées sous régime hypercalorique du fait d'une restauration du taux d'IGF-1 (Dunn, S.E. et al. 1997; Moore, T. et al. 2008b). Cela démontre l'implication de l'IGF-1 dans le développement tumoral.

L'IGF-1 agit soit directement après fixation sur son récepteur soit indirectement *via* des interactions avec des molécules suppresseurs de tumeurs telles que p53 (Takahashi, K. and Suzuki, K. 1993). La liaison de l'IGF-1 à son récepteur induit la dimérisation et la phosphorylation de résidus tyrosine. Cela entraîne le recrutement de protéines à domaine SH2, protéines connues pour activer de nombreuses voies de signalisation comme les voies MAPK, PI3K, Akt et mTOR engagées dans les processus mitogéniques et anti-apoptotiques (Braun, S. et al. 2011) (**Figure 81**).

Les voies de signalisation MAPK et PI3K sont particulièrement impliquées dans la stimulation de la prolifération des cellules cancéreuses mammaires MCF-7 par l'IGF-1 (Jackson, J.G. et al. 1998). La balance énergétique module les voies de signalisation Akt, AMPK et mTOR (Braun, S. et al. 2011). En effet, l'obésité est associée à une stimulation de la voie de signalisation PI3K/Akt/mTOR (Dann, S.G. et al. 2007; Moore, T. et al. 2008a) et à l'inverse, la baisse du taux d'IGF-1, suite à une restriction calorique, réduit l'activation de ces voies (Moore, T. et al. 2008a). Le système IGF est également impliqué dans les processus d'invasion et de migration des cellules transformées. L'inhibition de l'expression d'IGF-1R dans la lignée cancéreuse mammaire MDA-MB-435 entraîne, *in vitro* et *in vivo*, une moindre capacité d'adhésion, de migration et d'invasion (Dunn, S.E. et al. 1998). L'IGF-1 agit également en synergie avec les œstrogènes en stimulant l'activité transcriptionnelle du récepteur des œstrogènes (RE) (Sachdev, D. and Yee, D. 2001). Ainsi, pour les lignées cancéreuses mammaires qui expriment le RE (RE⁺) comme les cellules MCF-7, la stimulation par l'IGF-1 accroît la prolifération contrairement aux lignées qui n'expriment pas le RE (RE⁻) telles que les cellules MDA-MB-231 (Godden, J. et al. 1992; Stewart, A.J. et al. 1992).

III-2-2 L'IGF-1 dans l'immunosurveillance

Outre son effet sur les cellules cancéreuses, l'IGF-1 peut également moduler les cellules immunes. En effet, son récepteur est exprimé par les monocytes, les LT, les LB et les cellules NK (Kooijman, R. et al. 1992). *In vitro*, l'IGF-1 est capable d'activer la voie de signalisation Akt dans les LT stimulés induisant ainsi une résistance à l'apoptose médiée par Fas (Walsh, P.T. and O'Connor, R. 2000). L'IGF-1 provoque également une diminution de la sécrétion d'IFN- γ et une augmentation de la production d'IL-10 par les LT activés (Kooijman, R. and Coppens, A. 2004). L'IL-10 étant une cytokine immunosuppressive, cela suggère que l'IGF-1 pourrait participer à l'échappement tumoral en inhibant la réponse immune anti-tumorale. Ce facteur de croissance induit également la production d'IgE et d'IgG4 par les LB (Kimata, H. and Fujimoto, M. 1994) et de TNF- α par les monocytes (Renier, G. et al. 1996) et inhibe l'apoptose des granulocytes (Kooijman, R. et al. 2002). De plus, il

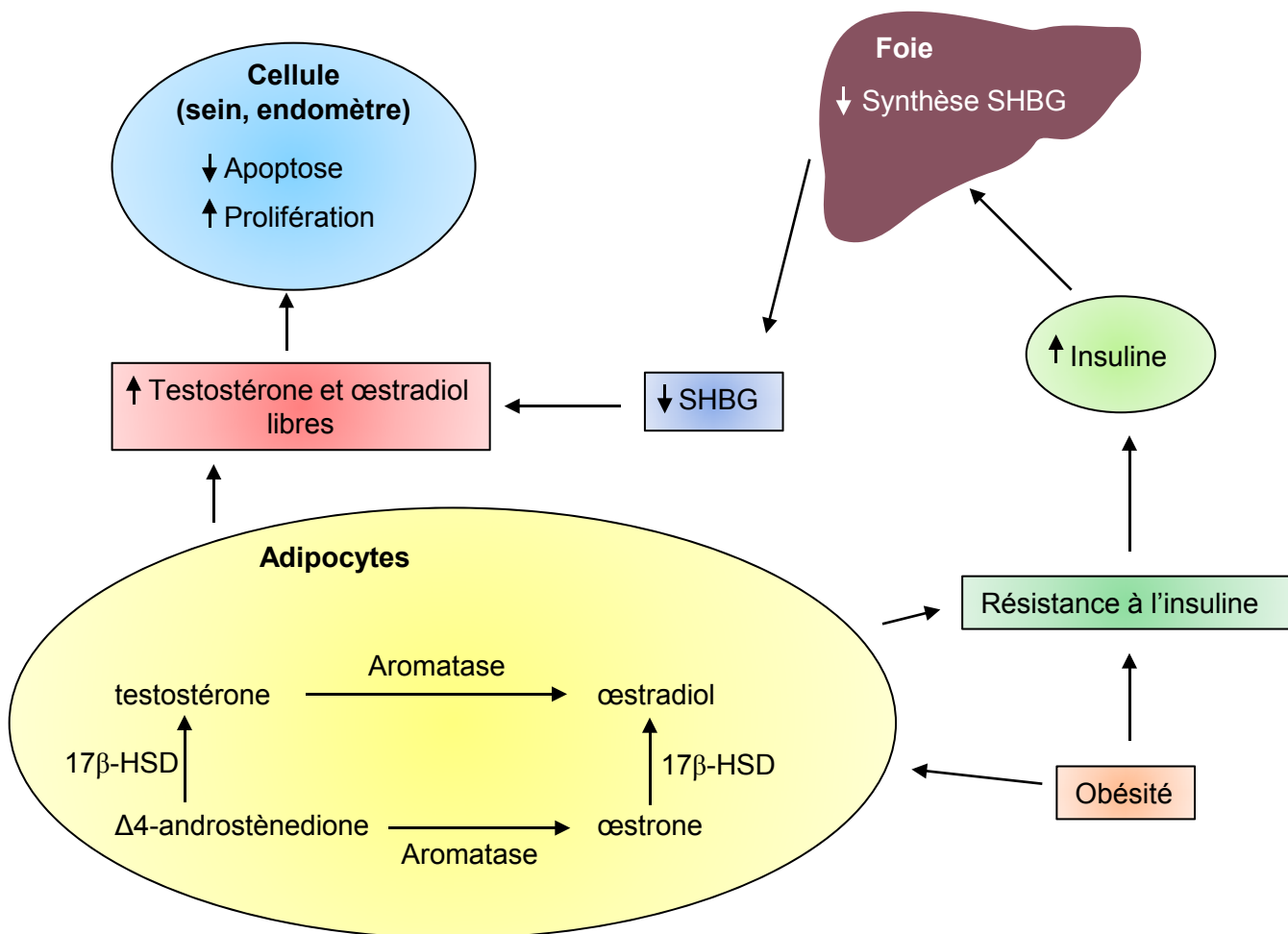


Figure 82 : **Effet de l'obésité sur la production de certaines hormones**

17β-HSD : 17β hydroxystéroïde dehydrogénase ; SHBG : sex-hormone binding globulin

(D'après Calle, E.E. and Kaaks, R. 2004)

stimule, *in vitro*, l'activité des cellules NK (Kooijman, R. et al. 1992; Bidlingmaier, M. et al. 1997). Ainsi, l'IGF-1 pourrait également participer à la réponse immune anti-tumorale. Néanmoins, ces différentes études ont été réalisées uniquement *in vitro* et des études complémentaires *in vivo* sont nécessaires pour déterminer l'implication de ce facteur de croissance dans la vigilance anti-tumorale.

III-3 Les œstrogènes

Chez l'homme et chez la femme post-ménopausée, le tissu adipeux est la principale source des œstrogènes. Les taux circulants d'œstrone et d'œstradiol sont corrélés à l'IMC (Key, T.J. et al. 2003). Cette synthèse est réalisée par un complexe enzymatique nommé aromatase cytochrome p450 codé par le gène CYP19 qui convertit les androgènes circulants tels que la testostérone ou l'androstènedione en œstrogènes (Calle, E.E. and Kaaks, R. 2004) (**Figure 82**). L'expression de l'aromatase est positivement corrélée à l'IMC (Lorincz, A.M. and Sukumar, S. 2006). Le tissu adipeux influence également la biodisponibilité des œstrogènes. En effet, un excès de tissu adipeux est associé à une hyperinsulinémie qui en retour inhibe la synthèse hépatique de la protéine circulante « sex-hormone binding globulin » (SHBG). Cette dernière lie avec une forte affinité la testostérone et l'œstradiol et la diminution de la synthèse de SHBG contribue donc à augmenter la fraction circulante libre de ces deux hormones (Calle, E.E. and Kaaks, R. 2004) (**Figure 82**).

III-3-1 Les œstrogènes dans la cancérogenèse

Chez la femme en post-ménopause, le risque de développer un cancer du sein est associé à la biodisponibilité accrue en œstrogènes non seulement au niveau circulant mais, également au niveau tissulaire (Key, T.J. et al. 2003; Kaaks, R. et al. 2005). En effet, l'activité de l'aromatase est stimulée dans le tissu adipeux adjacent à la tumeur mammaire (O'Neill, J.S. et al. 1988). La concentration d'œstrogènes dans ce tissu est dix fois plus élevée que celle retrouvée au niveau systémique (van Landeghem, A.A. et al. 1985). Cela suggère que la tumeur interagit avec les adipocytes pour stimuler la production d'aromatase (Bulun, S.E. et al. 1994). D'autres facteurs, tels que le TNF- γ et l'IL-6, sécrétés par les adipocytes, peuvent également agir de manière autocrine ou paracrine afin d'accroître l'expression et l'activité de l'aromatase (Purohit, A. et al. 2002).

Il existe deux formes de récepteurs des œstrogènes, le RE- α et le RE- β (Le Romancer, M. et al. 2011). Dix à 20% des cellules épithéliales mammaires expriment le RE- α (Russo, J. et al. 1999). Des souris déficientes pour RE- α développent une glande mammaire rudimentaire confirmant que l'expression de ce récepteur est essentielle au développement mammaire (Couse, J.F. and Korach, K.S. 1999). A l'inverse, des souris déficientes pour RE- β ont un développement mammaire normal (Couse, J.F. and Korach, K.S. 1999). Il apparaît donc qu'au sein des cellules épithéliales mammaires, le RE- β agit de façon antagoniste au RE- α en inhibant les capacités prolifératives des œstrogènes

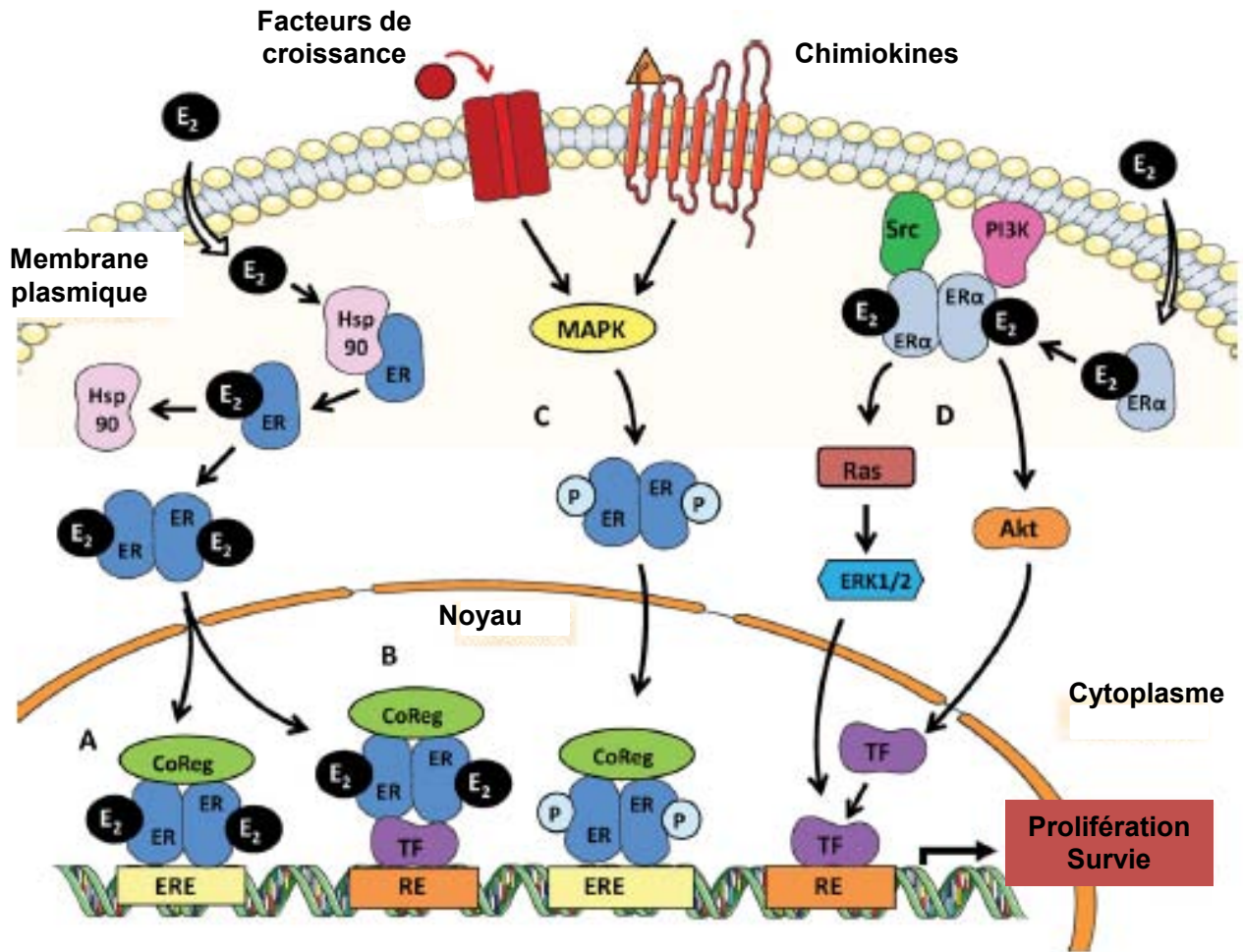


Figure 83 : Voies de signalisation des récepteurs des œstrogènes

ER : Récepteur des œstrogènes.

(D'après Le Romancer, M. et al. 2011)

(Treeck, O. et al. 2010). Par conséquent, le RE- β peut jouer un rôle protecteur dans le cancer du sein en réduisant la prolifération et l'invasion (Lazennec, G. et al. 2001). Ainsi, le ratio RE- α /RE- β est plus élevé dans les biopsies de tumeurs mammaires que dans le tissu mammaire sain (Roger, P. et al. 2001). Chez les femmes post-ménopausées obèses, les cellules tumorales mammaires expriment le plus souvent le RE- α (Cleary, M.P. and Grossmann, M.E. 2009).

Les effets des œstrogènes sur le tissu mammaire normal ou malin passent principalement par le RE- α et aboutissent à des actions génomiques par des régulations transcriptionnelles (McDonnell, D.P. and Norris, J.D. 2002) ou non génomiques *via* des cascades de signalisation membranaire et cytoplasmique (Levin, E.R. 2009b). Le mode d'action classique des RE nécessite, après fixation du ligand, un changement conformationnel du récepteur permettant sa dissociation du complexe Hsp et sa phosphorylation (Le Romancer, M. et al. 2011). Ces modifications déclenchent l'homo ou l'hétérodimérisation du RE responsable de la translocation du complexe dans le noyau. Au niveau nucléaire, le complexe se lie aux éléments de réponse aux œstrogènes (ERE) de gènes cibles et induit leur transcription. Le changement de conformation des RE suite à la fixation des œstrogènes facilite également l'association de complexes co-régulateurs sur l'homo ou l'hétérodimère du RE, complexes capables de remodeler la chromatine et permettre ainsi la transcription des gènes (**Figure 83A**) (Le Romancer, M. et al. 2011). Les RE peuvent aussi réguler l'activité d'autres facteurs de transcription par des interactions du type protéine-protéine (Kushner, P.J. et al. 2000) (**Figure 83B**). Parmi ces facteurs de transcription il y a l'activator protein-1 (AP-1) (Bjornstrom, L. and Sjoberg, M. 2004), le NF- κ B (Quaedackers, M.E. et al. 2007) et STAT 5 (Bjornstrom, L. et al. 2001).

Les RE peuvent également être activés par des voies de signalisation indépendantes des œstrogènes impliquant des kinases après engagement des récepteurs de facteurs de croissance tel que l'IGF-1R (Lorincz, A.M. and Sukumar, S. 2006) et de récepteurs de chimiokines tel que le CXCR4 (Sauve, K. et al. 2009) (**Figure 83C**). En effet, en absence d'œstradiol, l'IGF-1 est capable de stimuler l'activité transcriptionnelle des RE *via* la voie MAPK ou PI3K qui induit la phosphorylation des RE et permet ainsi leur translocation dans le noyau (Le Romancer, M. et al. 2011) (**Figure 83C**). De plus, l'inhibition par des inhibiteurs spécifiques des voies de signalisation MAPK ou PI3K abolit l'effet mitogénique de l'IGF-1 et des œstrogènes dans les cellules cancéreuses mammaires humaines (Lobenhofer, E.K. et al. 2000; Jackson, J.G. et al. 2001). Outre leur activité transcriptionnelle qui peut prendre quelques heures du fait de la production d'ARNm et de protéines, les œstrogènes peuvent induire des effets rapides dits « non génomiques » (Wehling, M. 1997). Les récepteurs impliqués dans ce phénomène restent controversés (Pappas, T.C. et al. 1995; Hammes, S.R. and Levin, E.R. 2007). Toutefois, il a été mis en évidence que cette activité serait en partie médiée par une petite fraction de RE- α localisée aux niveaux extra ou intramembranaire (Levin, E.R. 2009a). Après fixation des œstrogènes, les RE- α forment des homodimères (Razandi, M. et al. 2004) capables d'activer

différentes voies de signalisation grâce à des interactions avec diverses protéines telles que la PI3K et les tyrosines kinases Src (**Figure 83D**). Les deux voies de signalisation majeures ainsi activées sont les voies Src/ras/MAPK et PI3K/Akt qui médient des réponses biologiques de façon génomique ou non génomique (Le Romancer, M. et al. 2011). Toutes les activités transcriptionnelles, génomiques et non génomiques des RE, précédemment décrites, aboutissent à l'expression de gènes impliqués majoritairement dans la prolifération et la survie des cellules suggérant l'implication des œstrogènes dans le développement tumoral (O'Lone, R. et al. 2004). En ce qui concerne les œstrogènes exerçant des effets de manière non génomique, des études rapportent que l'activation des voies Src/ras/MAPK et PI3K/Akt stimule la prolifération (Pedram, A. et al. 2009), l'agressivité (Azuma, K. et al. 2009) et la survie (Fernando, R.I. and Wimalasena, J. 2004) des cellules MCF-7.

Les voies génomiques et non génomiques des RE sont complémentaires et interagissent entre elles. Les effets de ces deux voies pourraient s'associer afin de déclencher une réponse aux œstrogènes unique durant laquelle les voies de signalisation non génomique convergent vers une régulation au niveau transcriptionnel (Ordóñez-Moran, P. and Muñoz, A. 2009).

III-3-2 Les œstrogènes et la vigilance anti-tumorale

Outre leurs effets sur le développement tumoral, les œstrogènes modulent également les cellules immunes. Les récepteurs des œstrogènes (RE- α et RE- β) sont retrouvés sur une majorité de cellules immunes : les LT CD4, les LT CD8, les LB (Pierdominici, M. et al. 2010), les DC (Mao, A. et al. 2005), les monocytes/macrophages (Mor, G. et al. 2003) et les cellules NK (Pierdominici, M. et al. 2010). Les œstrogènes stimulent la prolifération des LT CD4 et des LT CD8 *via* notamment la phosphorylation d'ERK (Pierdominici, M. et al. 2010). Ces hormones induisent également une sur-expression des récepteurs de chimiokines CCR1 et CCR5 dans les LT CD4 augmentant ainsi leur potentiel migratoire en réponse aux chimiokines (Mo, R. et al. 2005). Par ailleurs, des études contradictoires sur les LT CD4 montrent que les œstrogènes sont capables de stimuler la réponse de type Th1 (Bebo, B.F., Jr. et al. 2001; Maret, A. et al. 2003) alors que d'autres démontrent un accroissement de la réponse de type Th2 (Bebo, B.F., Jr. et al. 2001). Cette différence est due au fait que les œstrogènes exercent une action biphasique sur la différenciation Th1/Th2 des LT. En effet, à faible dose ils induisent une réponse de type Th1 (sécrétion d'IFN- γ , d'IL-12 et de TNF- α) alors qu'à forte dose ils orientent les LT CD4 vers une réponse de type Th2 (sécrétion d'IL-10 et d'IL-4) (Bebo, B.F., Jr. et al. 2001). Des deux récepteurs des œstrogènes, seul RE- α est nécessaire pour induire la réponse de type Th1 *in vivo* (Maret, A. et al. 2003). Ces données suggèrent qu'en situation d'obésité où l'on observe de fortes concentrations d'œstrogènes, les LT CD4 pourraient participer au développement tumoral par la sécrétion d'IL-10 dotée d'effets immunosuppresseurs. Les œstrogènes peuvent également contribuer à l'échappement tumoral en stimulant la production de LTreg. En effet,

ces cellules expriment le RE- α et les œstrogènes différencient les LT CD4⁺ CD25⁻ en LT CD4⁺ CD25⁺ surexprimant les gènes de Foxp3 et de l'IL-10, caractéristiques des LTreg (Tai, P. et al. 2008). Cette différenciation des LTreg est inhibée par l'utilisation d'un inhibiteur des RE suggérant l'implication des récepteurs des œstrogènes dans ce processus (Tai, P. et al. 2008). La différenciation des cellules DC est également stimulée par les œstrogènes (Paharkova-Vatchkova, V. et al. 2004). Ces derniers induisent la sur-expression des molécules de co-stimulation et du CMH de classe II à la surface des DC, stimulant ainsi leur capacité à présenter l'antigène (Paharkova-Vatchkova, V. et al. 2004; Siracusa, M.C. et al. 2008). De plus, l'inhibition de la différenciation et de l'expression de ces molécules à la surface des DC, suite à l'utilisation d'un inhibiteur des RE, démontre que les effets des œstrogènes passent par leurs récepteurs (Siracusa, M.C. et al. 2008). Des études contradictoires révèlent que les œstrogènes stimulent ou inhibent la production monocyttaire de TNF- α (Asai, K. et al. 2001; Bouman, A. et al. 2004), d'IL-12 (Matalka, K.Z. 2003) et d'IL-1 β (Morishita, M. et al. 1999; Bouman, A. et al. 2004). Les deux formes de récepteurs des œstrogènes sont exprimées par les monocytes et les macrophages (Mor, G. et al. 2003). Toutefois, les monocytes expriment davantage le RE- β alors que les macrophages sur-expriment le RE- α (Mor, G. et al. 2003). Les œstrogènes induisent l'apoptose des monocytes exprimant RE- β *via* une augmentation de la production de Fas-L alors qu'ils n'ont aucun effet sur les monocytes différenciés en macrophages exprimant RE- α (Mor, G. et al. 2003). De plus, ces hormones ne modulent pas l'expression du RE- β dans ces deux types cellulaires mais, stimulent la production de RE- α dans les macrophages (Murphy, A.J. et al. 2009). Ces données suggèrent que le RE- α joue un rôle important dans la régulation des macrophages.

Les œstrogènes sont également capables de moduler les cellules NK. De fortes doses d'œstrogènes inhibent l'activité cytotoxique (Ferguson, M.M. and McDonald, F.G. 1985) et stimulent la production intracellulaire d'IFN- γ (Pierdominici, M. et al. 2010) des cellules NK humaines. Par ailleurs, les cellules NK spléniques murines mises en présence d'œstrogènes ont une cytotoxicité, une prolifération et une production intracellulaire d'IFN- γ diminuées (Hao, S. et al. 2008). Elles sur-expriment le récepteur inhibiteur CD94 ce qui pourrait expliquer la réduction de leur activité lytique (Hao, S. et al. 2008). Dans cette même étude, les auteurs montrent que les œstrogènes modulent également l'expression de gènes impliqués dans la production de cytokines, la cytotoxicité et la prolifération des cellules NK (Hao, S. et al. 2008). En réponse à des injections quotidiennes d'œstrogènes à des souris ovariectomisées, pendant 2 semaines, la production intracellulaire d'IFN- γ et le nombre de cellules NK spléniques sont augmentés. En revanche, l'expression du marqueur d'activation CD69 et la cytotoxicité de ces cellules sont réduites (Hao, S. et al. 2007). Les effets des œstrogènes sur les cellules NK passeraient notamment par l'augmentation ou la réduction de l'expression de gènes impliqués respectivement dans la prolifération et la cytotoxicité (granzyme B,

NKp46 et NKG2D) (Hao, S. et al. 2007). Ces données suggèrent que les œstrogènes peuvent également contribuer à l'échappement tumoral en inhibant l'activité cytotoxique des cellules NK.

Objectifs du travail de thèse

Objectifs du travail de thèse

Les cellules Natural Killer (NK) sont avant tout des cellules tueuses qui, conjointement avec les autres cellules du système immunitaire inné (monocytes, macrophages, polynucléaires, cellules dendritiques et lymphocytes T $\gamma\delta$), repèrent les cellules cancéreuses ou infectées par un micro-organisme afin de les éliminer par un mécanisme dit cytotoxique. Parallèlement, les cellules NK sécrètent des cytokines qui stimulent et orientent la réponse des autres agents de l'immunité tels que les macrophages, les cellules dendritiques ou les lymphocytes. Les activités de ces cellules immunocompétentes sont modulées par des facteurs nutritionnels et métaboliques. Les cellules néoplasiques ont mis en place différents mécanismes pour contourner la lyse et ainsi favoriser la transformation et la croissance des cellules malignes. L'échappement tumoral est lié à une immunosuppression et notamment à une altération numérique et fonctionnelle des cellules NK.

Les personnes obèses présentent une immunodéficience avec une réduction du nombre et de la cytotoxicité des cellules NK. Une alimentation hypercalorique, cause de surpoids ou d'obésité, est positivement corrélée au risque de développer un cancer mammaire chez la femme ménopausée. L'obésité se traduit au niveau circulant par une hyperleptinémie. La leptine, protéine sécrétée principalement par le tissu adipeux, est une composante majeure du stroma mammaire. Des travaux réalisés au sein de notre équipe de recherche ont montré que la leptine module *in vitro* la prolifération tumorale mammaire et que le récepteur de cette adipokine (Ob-R) est exprimé dans le tissu tumoral. Si la leptine influence le développement tumoral, ses mécanismes d'action sur les défenses anti-tumorales et en particulier sur les cellules NK sont encore mal définis.

En situation de cancer mammaire, une déplétion en arginine, résultant d'une consommation accrue de cet acide aminé par les cellules myéloïdes suppressives et par la tumeur, est fréquemment rapportée aux niveaux local et systémique. Celle-ci provoque l'inhibition de la prolifération et de l'expression de la protéine signal ζ du TCR et bloque le cycle cellulaire en phase G0-G1 des lymphocytes T. Toutefois peu d'études se sont intéressées à l'effet d'une telle déplétion sur les cellules NK.

Dans ce contexte, nous avons cherché à identifier et à comprendre les altérations fonctionnelles des cellules NK en situation de stress nutritionnel et de cancer mammaire. Ainsi, notre travail peut être divisé en trois volets.

- Tout d'abord, l'influence *in vivo* d'un régime hypercalorique sur le développement tumoral et la vigilance anti-tumorale des cellules NK dans un modèle expérimental de cancer mammaire par

xénogreffe chez la souris « nude » a été explorée. (*Publication N°1, soumise à Molecular Carcinogenesis*).

- Ensuite, les effets *in vitro* de la leptine à des concentrations supra-physiologiques sur la prolifération des cellules NK-92 et sur la cytotoxicité de ces cellules vis-à-vis de différentes lignées cancéreuses mammaires ont été étudiés. Les différents effecteurs de la réponse cytotoxique des cellules NK modulés par un excès de leptine ont également été caractérisés (*Publication N°2, soumise à Journal of Cellular Physiology*).

- Enfin, l'impact *in vitro* d'une déplétion en arginine d'une part sur la prolifération et les voies métaboliques de cet acide aminé dans un modèle de cellules NK humaines (NK-92), et d'autre part, sur la fonctionnalité des cellules NK-92 et des NK circulantes humaines ont été évalués. De plus, les mécanismes impliqués dans la modulation de la cytotoxicité des cellules NK par la déplétion en arginine ont été recherchés (*Publication N°3, soumise à Cellular Immunology*).

Partie II Travaux de recherche

Etude n°1

Impact *in vivo* d'un régime hypercalorique sur le développement tumoral mammaire et la réponse anti-tumorale des cellules NK

Bruno Lamas, Rachida Nachat-Kappes, Nicolas Goncalves-Mendes, Florence Mishellany, Adrien

Rossary, Marie-Paule Vasson and Marie-Chantal Farges

Molecular Carcinogenesis - Soumise

Présentation de l'étude n°1

Introduction

Parmi les facteurs environnementaux, une alimentation à forte densité énergétique associée à une faible activité physique est un facteur de risque de surpoids et d'obésité mais, également de pathologies, en particulier de cancer du sein chez la femme ménopausée. Les perturbations métaboliques liées à l'obésité se traduisent, entre autre, par une immunodéficience associée notamment à une diminution du nombre et de la cytotoxicité des cellules Natural Killer (NK). Ainsi, une réduction de l'activité de ces cellules immunes accroît le risque de néoplasie mammaire.

But de l'étude

Le but de cette étude est d'explorer l'impact d'un régime hypercalorique sur le développement tumoral mammaire humain et sur la vigilance anti-tumorale des cellules NK dans un modèle expérimental de cancer mammaire par xénogreffe chez la souris « nude ».

Matériels et Méthodes

Des souris Balb-c « nude » femelles âgées de 4 semaines ont été randomisées en deux groupes : le premier a été soumis à un régime normocalorique (NC : 2,82 kcal/g, L/G/P en % 3/60/16) et le second, à un régime hypercalorique (HC : 5,32 kcal/g, L/G/P en % 36/35/18) pendant 6 mois. Au bout de 5 mois, des cellules tumorales mammaires humaines (MCF-7 : 2×10^6 cellules, groupes NCT et HCT) ou le véhicule (groupes NC et HC) ont été implantées au niveau de la quatrième paire de glandes mammaires. Outre le suivi de la prise alimentaire, de l'évolution pondérale et tumorale, la composition corporelle a été déterminée par absorptiométrie biphotonique à 5 et 6 mois. L'impact du régime sur l'expression tumorale de gènes impliqués dans plusieurs fonctions cellulaires (glycolyse, cycle de Krebs, angiogenèse, inflammation, apoptose...) a été analysé par RT-qPCR *via* la technologie TaqMan Array. L'expression de marqueurs protéiques de la prolifération, de l'apoptose et de l'inflammation ainsi que l'expression des récepteurs hormonaux a également été recherchée au niveau tumoral par immunofluorescence. Le nombre de cellules NK dans le sang et dans la rate ainsi que la cytotoxicité des cellules NK spléniques vis-à-vis de cellules cibles leucémiques murines (YAC-1) ont été évalués par cytométrie en flux.

Résultats majeurs

En dépit d'une moindre prise alimentaire, les souris soumises au régime HC présentent une prise énergétique ainsi qu'une masse grasse significativement supérieure par rapport aux souris NC sans développer de surpoids. Sous régime HC, le développement tumoral s'accompagne d'une perte

de poids corporel total avec un volume et une masse tumorale significativement augmentés. Cette diète induit au niveau tumoral une sur-expression des ARNm d'enzymes impliquées dans la glycolyse (*HK2*, *PFKFB3* et *PFKFB4*) et une sous-expression des acteurs du cycle de Krebs (*SHDB* et *IDH3- α*) caractéristiques de l'effet Warburg. Le régime HC inhibe également l'expression tumorale de gènes impliqués dans le métabolisme des lipides (*PPAR- α*) et de l'adiponectine (*AdipoR1*) et induit une sur-expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse (*VEGFR2*). Le stress oxydant au niveau tumoral est également modulé par le régime HC *via* une régulation génique de certaines enzymes anti-oxydantes (*SOD-2*, *GPX-1* et *GPX-2*). L'expression protéique tumorale des récepteurs des œstrogènes β (RE- β) et à la progestérone (PgR) ainsi que de la caspase 3 clivée est diminuée sous régime HC. En revanche, l'expression du Ki67, un marqueur de prolifération, est augmentée dans les tumeurs des souris HCT. Le nombre et la cytotoxicité des cellules NK sont réduits sous régime HC. La présence de tumeurs mammaires stimule l'activité lytique des cellules NK mais, la cytotoxicité de ces cellules reste inférieure chez les souris sous régime hypercalorique *versus* le groupe NCT.

Conclusion

Chez la souris athymique, le régime HC, sans induire de surpoids, stimule la prolifération tumorale *via* la sur-expression de protéines impliquées dans la prolifération et la sous-expression de protéines pro-apoptotiques et de récepteurs hormonaux (RE- β et PgR). Cette prolifération accrue des cellules tumorales est également due à des modifications d'expression sous régime HC de gènes contrôlant plusieurs fonctions cellulaires (angiogenèse, stress oxydant, glycolyse, cycle de Krebs...). Cette diète réduit également le nombre et la cytotoxicité des cellules NK et contribue ainsi au développement tumoral mammaire.

Ces données *in vivo* contribuent à mieux comprendre l'influence d'une consommation d'aliments à forte densité énergétique sur le développement tumoral mammaire œstrogéno-dépendant et sur la réponse anti-tumorale des cellules NK.

Publication n°1

Dietary fat without body weight gain increases *in vivo* MCF-7 human breast cancer cells growth and decreases Natural Killer cytotoxicity

Bruno Lamas^{1*}, Rachida Nachat-Kappes¹, Nicolas Goncalves-Mendes¹, Florence Mishellany², Adrien Rossary¹, Marie-Paule Vasson^{1,3,4} and Marie-Chantal Farges¹

¹Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, Equipe ECRIN, CLARA, CRNH Auvergne; INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, F-63000 Clermont-Ferrand, France

²EA ERTICa, Service d'Anatomopathologie, Centre de lutte contre le cancer Jean Perrin, F-63000 Clermont-Ferrand, France

³Centre de lutte contre le cancer Jean Perrin, Unité de Nutrition, F-63000 Clermont-Ferrand, France

⁴CHU Clermont-Ferrand, Service Nutrition, F-63003 Clermont-Ferrand, France

***Correspondence to:** Bruno Lamas, Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire et Nutrition, UFR Pharmacie, 28 place Henri Dunant BP 38, 63001 Clermont-Ferrand cedex 1, France. Phone: +33 4 73 17 80 49; Fax: +33 4 73 17 80 38. E-mail: bruno.lamas@u-clermont1.fr

Acknowledge grant support: this work was supported by funding from the doctoral fellowship (Contrat Plan Etat Région and Fonds Européen de Développement Régional 2008) and the *Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche*.

Abbreviations: HC, high-calorie; ER, estrogen receptor; NK, natural killer; SC, standard calorie; FCS, fetal calf serum; HCT, high-calorie tumor; SCT, standard calorie tumor; E2, estradiol; DEXA, dual-energy X-ray absorptiometry; ROI, region of interest; OCT, optimal cutting temperature; IFC, immunofluorescence; NEFA, non-esterified fatty acids; ALT, alanine aminotransférase; ALP, alkaline phosphatase; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; GM-CSF, granulocyte macrophage colony factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; IGF-1, insulin growth factor-1; COX-2, cyclooxygenase-2; IL-1R, interleukin 1 receptor; DAPI, 4,6-diamidino-2phenolindole; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; β -GUS, glucuronidase β ; RQ, relative quantity; CFSE, carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester; PI, propidium iodide; ANOVA, analysis of variance; D, diet; T, tumor; DxT, interaction between diet and tumor; LSD, least significant difference; CDK2, cyclin-dependent kinase 2; PTEN, phosphatase and tensin homolog; TRADD, tumor necrosis factor receptor type 1-associated death domain protein; Fas, apoptosis stimulating fragment; VEGFR-2, vascular endothelial growth receptor 2; HIF-1 α , hypoxia-inducible factor 1 α ; HK2, hexokinase 2; PFKFB, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase; SDHB, succinate dehydrogenase complex subunit β ; IDH, isocitrate dehydrogenase; AdipoR1, adiponectin receptor 1; PPAR, peroxisome proliferator-associated receptor; GPX, glutathione peroxidase; SOD2, superoxide dismutase 2; PgR, progesterone receptor; Fas-L, Fas ligand; Ob-R, leptin receptor; Jak, janus kinase; MnSOD, manganese SOD.

Running title: High-calorie diet modulates breast tumor growth and NK cells activity

Key words: breast cancer; high-calorie diet; xenograft; NK cells

Abstract

High-calorie (HC) diet feeding contributes to the increased incidence of obesity, which is established as a risk factor for breast cancer in postmenopausal women in particular for estrogen receptor (ER) positive tumors. This study explored whether a HC diet increases human ER-positive breast cancer progression and modulated Natural Killer (NK) cell functions. Four-week-old female BALB/c athymic nude mice were fed HC diet (5320 kcal/kg) or standard diet (SC, 2820 kcal/kg) for 6 months. After 5 months, mice were implanted with MCF-7 breast cancer cells (SCT and HCT) or with an isovolumic injection (SC and HC) into the both inguinal fat pads. Tumor growth was higher in the HCT group compared to the NC group without change in the body weight. The HC diet decreased tumor expression of gene involved in citrate cycle and adiponectin and lipid metabolism whereas tumor expression of gene controlling glycolysis and angiogenesis were increased. Tumor expression level of Ki67 was enhanced while those of the cleaved caspase 3 and the ER- β and progesterone receptors were reduced. Tumor development in response to the HC diet was associated to a decreased number and cytotoxicity of splenic NK cells. These results indicate that a HC diet without body weight gain increases ER-positive breast cancer cell proliferation and reduces tumor apoptosis. The underlying mechanisms involved a decreased expression of tumor hormonal receptors, a reduced NK cell functions and might result also in the regulation of gene involved in several cellular functions.

Introduction

Breast cancer is the most common cancer affecting women worldwide [1]. Despite the decline in breast cancer mortality over most recent periods in Europe and the United States [2,3], it is still the second leading cause of death with respect to other cancers [4]. Breast cancer like other cancers is influenced by modifiable lifestyle or environmental factors [5].

Some dietary factors have been involved in the development of breast cancer. However, epidemiologic studies report conflicting results regarding an association of dietary fat with breast cancer risk. Indeed, prospective cohort and case-control studies have found little [6,7] or no [8,9] association between high fat intake and increase risk of breast cancer development while animal studies [10,11] have shown strong associations. High-fat diet induces obesity in humans and rodents [11,12]. Epidemiological studies suggest that obesity is an established risk factor for breast cancer development, particularly for estrogen receptor (ER) positive tumors, in postmenopausal women [13,14]. Animal models exploring the effects of a high fat diet on breast cancer generally used ER-negative cells [10,15]. Obesity is also associated with immune dysfunction [16] with impaired number and cytotoxicity of NK cells [17,18]. Belonging to the innate immune system, these cells are involved in the early host defense against infections and tumors and they may represent an additional mechanism linking fat diet and development and growth of tumors. It has yet to be determined whether, in non-obese individuals, the consumption of a high-calorie diet can stimulate the development of ER-positive breast cancer and reduces anti-tumor NK cell response.

In this study, we investigated whether the consumption of high-calorie diet affects breast cancer growth and therefore alters NK cell functions. A mammary cancer orthotopic model was used in which MCF-7 human mammary carcinoma ER positive cells were injected into the mammary fat pads of BALB/c athymic nude (*nu/nu*) mice. Although nude mice lack peripheral T cells, they do retain functional B and NK cells [19,20]. Moreover, BALB/c mice are known to be obesity-resistant with little effect of high-fat diet on body weight [21,22]. Our findings showed that the consumption of a high-calorie diet, without increasing body weight, stimulated human ER positive breast cancer growth, reduced tumor hormone receptor expression and altered NK cell cytotoxicity.

Materials and methods

Animals, diets, and mammary cancer xenograft

All procedures were conducted in accordance with ethical guidelines [23] and our local ethic committee (Comité Régional d’Ethique sur l’Expérimentation Animale, CE-17-09).

Four-week old female BALB/c *nu/nu* athymic mice were purchased from Charles River (L’Arbresle, France) and were acclimated for 2 weeks before being randomly assigned to different experimental groups. They were housed in individual cages with free access to a regular diet and sterile water (one per cage) within a pathogen-free isolation facility with 12:12-hr light:dark cycle at 22°C-24°C and 50% of humidity. Mice were randomly divided into two groups and fed *ad libitum* A04 (standard caloric diet (SC), SAFE (Augy, France)) or high-caloric (HC) diet (230 HF, SAFE) for 6 months.

The SC diet brings 2820 kcal/kg of food and is composed of 3% fat (270 kcal/kg), 60% carbohydrates (1910 kcal/kg, primarily starch) and 16% proteins (640 kcal/kg). The HC diet contains 5320 kcal/kg and includes 36% fat (primarily lard, 3220 kcal/kg), 35% carbohydrates (1400 kcal/kg mainly saccharose) and 18% proteins (700 kcal/kg). Fresh diet was supplied each day. Food consumption and body weight evolution were assessed three-weekly throughout the study.

Five months after the beginning of the diet protocol, mice of each group were randomly divided into two groups. Two of them were implanted with human breast carcinoma MCF-7 (human breast cancer) xenograft (SC Tumor (SCT) and HC Tumor (HCT) groups). MCF-7 was obtained from American Type Culture Collection (Manassas, MA) and maintained in complete RPMI 1640 Medium (Biowest, Nuaille, France) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Biowest), 100 µg/mL streptomycin (Sigma, St. Louis, MO), 100 U/mL penicillin (Sigma), 2 mM glutamine (Sigma) and cultured at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. Human ER⁺ breast cancer cell line MCF-7 was given fresh medium 1 day prior trypsinization. The MCF-7 cells at 70%-90% confluence were trypsinized, resuspended in FCS with 1:1 Matrigel (BD Biosciences, Bedford, MA) (vol/vol) at a concentration of 1×10^7 cells/mL and inoculated orthotopically at 2×10^6 cells in 200 µL in both sides into fourth mammary fat pads.

In parallel control groups received in the inguinal fat pad area an isovolumic injection of a mix of FCS and Matrigel (vol/vol) (SC and HC groups). Whatever the group, all of mice were also implanted *s.c.* with an estradiol (E2) pellet (1.7 mg, 60-day release, producing 3-4 nM E2 blood level; Innovative Research of America, Sarasota, FL).

After injection the mice continued on their respective. Each xenograft was monitored weekly by externally measuring tumors in two dimensions using a caliper. Tumor volume was calculated using the formula: $1/2 \text{ width} \times \text{length}^2$ [24].

Body composition analysis

A dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) using a Piximus apparatus (Lunar Corp., Madison, WI) with small animal software was used for body composition at 5 months after initiating the high-calorie diet and at 6 months i.e. after one month of tumor. Five mice belonging to the SC and HC groups and five from the SCT and HCT groups were anesthetized with ip administration of 100/10 mg/kg, ketamine-xylazine solution (Sigma) over the duration of the procedure. After image acquisitions, whole body fat and lean masses were determined by readjusting the region of interest (ROI) [25].

Blood and tissue sampling

At the sacrifice, mice were anesthetized with ketamine/xylazine (i.p., 100/10 mg/kg, Sigma) and blood was collected by cardiac puncture in heparinized tubes. Plasma samples were separated by centrifugation, aliquoted and stored at -80°C until analysis. Autopsies were performed and the abdomen and thoracic cavity were examined systematically for the presence of metastases. The tumors, spleens and major organs were excised, weighed and frozen for the most. Both right and left fat pad tumors were removed and weighed. One part was immediately frozen in liquid nitrogen for mRNA extraction and another one was embedded in OCT (Optimal Cutting Temperature) compound (Tissue Tek, Zoeterwoude, Netherlands) for immunofluorescence (IFC) study. Finally, some tumors were formalin-fixed and paraffin-embedded for routine histological examinations, where 4 µm sections were stained with hematoxylin and eosin (Sigma). The SBR grade classification modified by Elston and Ellis was used for grade tumors evaluation [26]. The spleens were frozen for NK cell cytotoxicity assay.

Plasma analysis

Plasma concentrations of non-esterified fatty acids (NEFA), albumin, alanine aminotransferase (ALT), alkaline phosphatase (ALP), total cholesterol, creatinine, glucose, high density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), total protein and triglycerides were measured on an automatic analyzer (Cobas-Mira plus, Roche Diagnostics, Meylan, France) by Anexplo platform (Genotoul, IFR BM-T, Toulouse France). Albumin, ALP, ALT, total cholesterol, creatinine, glucose, LDL, total protein and triglycerides were quantified with commercial kits from ABX Pentra Horiba (Montpellier, France), whereas NEFA and HDL were determined respectively with commercial kits from Wako (Fuggerstrasse, Germany) and Roche diagnostics (Meylan, France).

Procarta cytokine assay kit mouse (Affymetrix, High Wycombe, UK) was used to determine plasma levels of leptin, adiponectin, rantes, granulocyte macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) according to the manufacturer instruction on Luminex 100 IS (Luminex Corporation, Austin, TX).

Immunofluorescence staining and analysis

Rabbit mono or polyclonal primary antibodies for progesterone receptor (PgR) (clone SP2), for estrogen receptor α and β (ER α and β), for insulin growth factor-1 (IGF-1) and for cyclooxygenase 2 (COX-2) (clone SP21) were obtained from Abcam (Cambridge, MA, UK). Rabbit polyclonal primary antibodies for IL-1 receptor (IL-1R) and for cleaved caspases 3 were purchased respectively from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) and Cell signaling Technology (Beverly, MA). Secondary antibody donkey anti-rabbit alexa fluor 488 was obtained from Invitrogen (St. Aubin, France).

Frozen tumor sections (7 μ m) were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma) in PBS for 5 min followed by blocking with 5% goat serum (Sigma), 0.5% fish skin gelatin (Sigma), 0.1% Triton (Sigma) and 0.05% Tween-20 (Interchim, Montluçon, France) in PBS. Tissue sections were incubated overnight at 4°C with the indicated primary antibodies diluted in the same blocking buffer. After washing three times in PBS containing 0.05% Tween-20, sections were incubated for 1 h at room temperature with indicated secondary antibody coupled to alexa 488 (Invitrogen) and 4,6-diamidino-2phenolindole (DAPI) (0.5 μ g/mL) (Sigma) diluted in blocking buffer. DAPI was used to stain nuclei. Sections were washed in PBS containing 0.05% Tween-20 and finally mounted in Mowiol 4-88 (Calbiochem, St. Quentin en Yvelines, France). For negative controls, sections were incubated without primary antibodies. Confocal laser-scanning microscopy was performed with the confocal and multiphoton microscope system Leica TCS SP5 MP, equipped with 405 nm, 488 nm and 594 nm lasers and immersion lenses HC PL APO 20 \times 0.7 IMM, HCX PL APO 40 \times 1.25 Oil and HCX PL APO 63 \times 1.4 Oil (Leica Inc., Heidelberg, Germany). Digital images were prepared using the Leica LAS-AF Lite and Adobe Photoshop CS2 software (Adobe Systems Inc., San Jose, CA). The average number of stained positive cells per microscopic field (magnification X40 or X20) was quantified using the Particle Analyzer from ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). Images were subjected to the threshold function using the same threshold for all images for a group and then the number of particles in the image was counted and was normalized to tumors of SCT mice (set at 100%). Particles less than 30 pixels were excluded. Each quantification corresponds to the average number of positive cells observed in at least 10 different fields.

mRNA expression analysis by TaqMan array RT-qPCR

Tumor total RNA of SCT and HCT mice were isolated using TRIzol® Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. RNA concentration was determined with Nanodrop ND-8000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). Reverse transcription was performed with 1 μ g of total RNA, giving rise to 20 μ L of cDNA as previously reported [27]. Predesigned TaqMan array 96-well plates (Applied Biosystems, Courtaboeuf, France) were used in a

2-step RT-PCR process using the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) with 96-well standard block (Applied Biosystems). Each cDNA sample (1080 µL) was added to an equal volume of 2 x TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). After gentle mixing, the solution was transferred into wells (20µL per well). Each sample was analyzed in a single TaqMan array 96-well plate run for each of the 6 TaqMan array 96-well plates by using an Applied Biosystems 7900 H T Fast-Real-Time PCR System. Thermal cycle conditions were as follows: 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, 15 s at 95°C, and 1 min at 60°C for 40 cycles. Data acquisition was performed according to the manufacturer's suggestions. TaqMan gene expression assays (Applied Biosystems) were used for quantification of mRNA of the respective genes. Among the 4 housekeeping genes, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and glucuronidase β (β -GUS) showed good average expression stability and were selected as housekeeping genes with the NormFinder algorithm [28]. For analysis, expression levels of target genes were normalized to GAPDH and β -GUS for each plate. Gene expression values were then calculated on the basis of the $\Delta\Delta C_t$ method with normalized data. Tumors of SCT group were used as reference for tumors of HCT group. Relative quantities (RQs) were determined by using the equation $RQ = 2^{-\Delta\Delta C_t}$. Means of RQs obtained with the 2 housekeeping genes were used. Only genes with reproducible amplification curves were analyzed and presented.

NK number and cytotoxicity assays

The number of circulating NK cells was determined by flow cytometry. For this 50µL of blood were mixed to 898 µL of VersaLyse lysing solution (Beckman Coulter, Marseille, France)) and vortexed. After 15 min, the samples were stained with 2µL of anti-CD49b (clone DX5) (Beckman Coulter) during 15 min at room and in the dark. Shortly before analysis, 50µL of homogenized flow-count beads, see below, with a predefined number of beads per µl was added. The samples were gently mixed and measured on the flow cytometer (Epics XL, Beckman Coulter). For each samples a fixed number of events were counted.

Preparation of single-cell suspensions from spleen was performed with the gentleMACS Dissociator (Miletenyi Biotec, Paris, France) as previously described [29]. Number of splenic NK cells was determined by flow cytometry using anti-CD49b (clone DX5) (Beckman Coulter). Then, the cells were isolated with an NK cell isolation kit according to the manufacturer's recommendations (Miletenyi Biotec). Purity of NK cell samples was determined by flow cytometry as described above.

YAC-1 (mouse lymphoma) was obtained from American Type Culture Collection and maintained in complete RPMI 1640 Medium (Biowest) supplemented with 10% FCS, 100 µg/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin, 2 mM glutamine and cultured at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. YAC-1 cells were labeled with 7.5 µM carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE; Sigma) for 10 min at 37°C. These cells were washed twice before addition to cocultures with

splenic NK cells in 96-well plate at an effector:target ratio of 50:1. After 4 h of incubation at 37°C with 5% of CO₂, propidium iodide (PI) (250 µg/mL; Sigma) was added to stain dead cells. Cytotoxic activity was analyzed by flow cytometry. Percent splenic NK cytotoxic activity was calculated as follows: cytotoxicity (%) = [(dead target cells (%) - spontaneously dead target cells (%)) / (100 - spontaneously dead target cells (%))] x100.

Statistics

Data are presented as means ± SE. When the four groups were compared, two-way analysis of variance (ANOVA) (Statistica StatSoft version 5.0, Maisons-Alfort, France) with the factor diet (D) (SC or HC) and the factor tumor (T) (presence or absence) was performed to assess statistical significances (p<0.05). When the ANOVA indicated a significant interaction between factors (DxT), individual means were compared with least significant difference (LSD) post hoc test (Statistica StatSoft), different from control mice (NC or HC), ‡ p<0.05; different from mice fed SC diet, † p<0.05. In experiments with only two sets of data or in absence of interaction, the statistical analysis was performed by Mann-Whitney test on Statview 5.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC), * p<0.05. For mRNA expression, data were analyzed using a Student's t test to compare the tumor gene expressions of HCT mice *versus* the ones of SCT mice; *p<0.05 was considered statistically significant.

Results

In absence of body weight gain, the HC diet in tumor bearing mice is associated to a decrease in body fat and lean masses

The daily food consumption (g/day) was lower in mice fed HC diet (HC: 4.8 ± 1.7 vs SC: 5.8 ± 0.7 ; $p < 0.05$; HCT: 4.5 ± 1.5 vs SCT: 5.9 ± 0.8 ; $p < 0.05$), but the daily caloric intake (kcal/day) was significantly higher in the HC and HCT groups compared to the others (Figure 1A,B). Whatever the diet, the daily calorie intakes were unchanged after the human breast cancer xenograft and tumor development and growth (Figure 1B). Mean body weight was not different in mice fed HC diet than in controls for the remaining 5 months of the feeding (Figure 1C). After correction for differences in tumor weight, the final body weight of the HCT group was significantly reduced compared to those of HC and SCT groups (Figure 1D).

The HC diet, given for 5 or 6 months, promoted both subcutaneous and visceral adipose depots (+ 21% vs NC) (Figure 1E,G) without affecting the lean body mass (Figure 1F,H). The tumor development did not alter significantly the body fat and lean mass in the SCT group compared to the SC group (Figure 1G). The tumor development induced a significant reduction both in the lean and the fat masses in the HCT group compared with its control group (Figure 1G,H). Moreover lean mass in the HCT group was significantly reduced compared to the SCT group (Figure 1H).

The HC diet promotes solid tumor growth of MCF-7 cells in BALB/c athymic nude mice

During the two last weeks of the experiment, volume of tumors was significantly higher in the HCT mice (Figure 2A) and at the sacrifice, the weight of tumors was significantly increased in the HCT group compared to the SCT group (Figure 2B). The SBR grade classification performed by a pathologist revealed that all invasive tumors were ductal invasive carcinomas of grade III (data not shown). High-calorie diet consumption and presence of tumor did not alter the weight of other organs such as spleen, liver, kidneys, ovaries, brain and lungs (data not shown).

The HC diet and mammary tumor modulate biological circulating markers

Whatever the group, no significant difference was observed in the plasma levels of total proteins, albumin, ALT, creatinine, triglycerides, NEFA, LDL, leptin, adiponectin, Rantes and VEGF (Table 1). Nevertheless, plasma concentrations of triglycerides tended to be lower in tumor bearing mice whatever the diet (SCT and HCT groups) ($p = 0.08$ for the tumor factor, 2-way ANOVA) (Table 1). In the same groups, glycaemia was also significantly decreased compared to their respective controls (Table 2). Plasma levels of ALT were significantly reduced in mice fed the HC diet, mostly in the presence of tumors (Table 1). The HC diet reduced the plasma levels of GM-CSF whereas the tumor enhanced them whatever the diet (Table 1). However, circulating concentrations of GM-CSF

were significantly lower in the HCT mice compared the SCT group (Table 1). Total cholesterol was significantly increased in HCT mice while it was significantly reduced in SCT mice (Table 1). HDL concentration was elevated in the mice fed the HC diet, with the highest plasma levels observed in HCT mice (Table 1). Moreover, tumor is associated to a significant reduction in plasma levels of HDL only in the SCT group (Table 1).

The HC diet in control and tumor bearing mice reduces both the NK cell number and activity

Percentage of peripheral blood NK cell was unchanged after 6 months of HC diet (Figure 3A). Although the presence of tumor had no effect in the SCT group, a significant reduction in the percentage of blood NK cells was observed in the HCT mice compared to SCT and HC groups (Figure 3A). A long high-caloric consumption in nude mice also decreased significantly the number of splenic NK cells independently of the presence or the absence of the tumor ($p=0.04$ for the diet factor, 2-way ANOVA) (Figure 3B). Moreover, the HC diet decreased the splenic NK cytotoxicity in the presence or in the absence of tumor and this lytic activity was stimulated by tumor whatever the diet (Figure 3C). Nevertheless, the splenic NK cell cytotoxicity was reduced in the HCT group compared to the SCT one (Figure 3C).

The HC diet regulates mammary tumor expression of genes involved in carcinogenesis

Ninety-two genes enrolled in mammary carcinogenesis and sensitive to nutrient regulation were studied. Among them, 12 were not amplified, whereas 14 showed Ct values too high (>40 Ct) to be considered (Supplemental Table 1). In the remaining genes, 20 were significantly regulated by the HC diet (Table 2). Cyclin-dependent kinase 2 (*CDK2*) and *c-Myc* were decreased by the HC diet whereas *PTEN* was increased, suggesting that this diet inhibited the tumor cell cycle progression (Table 2). The HC diet also regulated the cell cycle by altering the expression of inhibitors of G1-specific CDK-cyclin complexes as *p27* (Table 2). Additionally, it induced the expression of apoptotic gene *TRADD* and reduced the gene expression of the death receptor *Fas* (Table 2). Tumors of mice fed the HC diet expressed higher *VEGFR-2* and lower *HIF-1 α* genes compared to tumors of mice fed the SC diet. So, a HC diet might play a role in angiogenesis (Table 2). This diet also induced tumor over-expression of enzymes mRNA involved in glycolysis (*HK2*, *PFKFB3* and *PFKFB4*) and a down-expression of mRNA citrate cycle actors (*SDHB* and *IDH-3 α*), characteristics of the “Warburg effect” (Table 2). However, the *PFKFB2* gene expression was decreased in the tumors of mice fed the HC diet (Table 2). Adiponectin and lipid metabolisms were also regulated with the HC diet which decreased both *AdipoR1* and *PPAR- α* gene expression (Table 2). The HC diet played a role in tumor stress response by increasing *GPX-1* and decreasing *GPX-2* and *SOD-2* gene expressions respectively (Table 2). Expression of *β -Catenin* mRNA was also down-regulated in tumors of mice fed with the HC diet suggesting a decreased tumor cell adhesion (Table 2).

The HC diet stimulates tumor proliferation and reduces tumor apoptosis and hormone receptor expression.

Immunofluorescence analysis revealed a more Ki67 positive cells in the tumor of the HC fed mice compared to the SC fed mice (Figure 4). Additionally, cleaved caspase 3 detection was decreased in tumor of mice fed the HC diet (Figure 4). Expression of COX-2 was higher in the HCT group but this difference was not statistically significant ($p=0.27$, Figure 4). Tumor IL-1R and IGF-1 expressions were also unchanged whatever the diet (Figure 4). The HC diet regulated hormone response by altering the expression of hormone receptors such as ER- β and PgR (Figure 4). However, it did not modulate the ER- α expression (data not shown).

Discussion

The relationship between HC feeding and breast cancer led to conflicting results [7,8,10]. The objective of this study was to determine whether a HC diet, in obesity-resistant BALB/c nude mice, stimulates human ER⁺ mammary cancer growth and modulates NK cell cytotoxicity. The major result was that a high energy intake, without affecting other nutrients (except for fat and carbohydrates) and body weight, increased ER⁺ mammary cancer growth. Even if the HC diet did not affect the mice body weight, the body fat mass was slightly increased relative to that of control mice. Moreover, tumor growth reduced body fat and lean mass only in the HCT group. Consequently, mice body weight of the HCT group was decreased compared to HC and SCT mice after correction for differences in tumor weight. In this experimental model, the HC diet increased solid tumor growth of MCF-7 human mammary carcinoma cells in obesity-resistant BALB/c athymic nude mice. Experimental models of HC diet are not systematically associated with enhanced body weight and visceral fat accumulation. C57BL/6J mice are obesity prone while BALB/c mice are obesity resistant [22]. The resistance to obesity of the BALB/c nude mouse strain in response to the HC diet might arise from increased thermogenic capacity and improved fat catabolism as recently reported [30]. Fat mobilization results not only from increased lipolysis and fatty acid oxidation but also from a leptin independent adipocyte lipolysis control mediated by the adipose triglyceride lipolysis [30]. HC diets are generally rich in fat, particularly in saturated lipids up to 60% [10,11,15]. In our experiment, the fat content of the diet was only 36%.

NK cells belong to the innate immune system and are involved in anti-infectious and anti-tumoral responses [31,32]. Thus, they play an important role in host defense against breast cancer cells [33]. Our findings demonstrated that, a HC diet reduced splenic NK cell number. Additionally, tumor associated with the HC diet decreased the percentage of blood NK cells and the cytotoxicity of splenic NK cells against murine targets (YAC-1) whereas tumor stimulated NK cell lytic activity in mice fed the SC diet. This reduction of NK cytotoxicity may partly explain the enhanced development of mammary tumor in the HCT group. Apoptosis mediated by the TNF- α factor *via* Fas Ligand (Fas-L) plays a role in the anti-tumor action of the NK cells after fixation on Fas death receptor expressed on tumor cell surface [32,34]. In our experiment, *Fas* mRNA expression was decreased in tumor of mice fed with the HC diet suggesting that, these tumors might be less sensitive to the NK cell cytotoxicity mediated by Fas-L than tumors of the control mice. The GM-CSF is produced by various cell types including macrophages, T lymphocytes, endothelial cells and NK cells [35-37]. Plasma level of GM-CSF was reduced by the HC diet and tumor increased it only in controls. This cytokine, known to stimulate indirectly the NK cell activity [38,39], could be involved in the depressed NK cell lytic activity in the HCT group. Indeed, mice feeding a diet-induced obesity display a higher susceptibility to influenza as a result of a significant reduction in splenic NK cell cytotoxicity against YAC-1 [40]. Moreover, altered phenotype of NK cells from obese rats can be normalized by transfer into lean

animals, supporting the fact that NK functions depend on the surrounding metabolic and endocrine environment [41]. Diet-induced obesity leads to altered distribution of NK cells in the periphery as well as leptin resistance that is not caused by a decrease of Ob-R expression but by an abrogated postreceptor signaling [41]. Impaired leptin-mediated NK cell activation by Jak-2 signaling inhibition could be the mechanism responsible for NK cell dysfunction in rats with diet induced obesity [42]. In addition, leptin is involved in the progression of breast cancer [43,44]. However, in our model, plasma leptin level was unchanged whatever the diet and independently of the presence of tumor, suggesting that others metabolic or endocrine factors were involved in the NK cell dysfunction.

Obesity is associated with altered lipid metabolism as shown by high circulating levels of triglycerides, LDL and low concentrations of HDL characteristics of the metabolic syndrome [45,46]. In our experimental conditions, plasma level of HDL was increased in response to the HC diet. Similarly to that observed for the SCT group, in patients, breast cancer induces lower levels of HDL than in control subjects [47,48]. Such reduction was not observed in the HCT group. *In vitro* studies have shown that HDL stimulates the proliferation of ER⁺ and ER⁻ mammary tumor cell lines including MCF-7 cells [49,50]. Thus, the elevated HDL concentration in mice fed the HC diet could enhance tumor growth. Although HDL level influenced breast cancer proliferation, total cholesterol was not associated with breast cancer risk [51]. Consequently, variations of total cholesterol concentrations in SCT and HCT groups might not influence the tumor growth. The peroxisome proliferator-activated receptor- α (PPAR- α) which regulate the lipid metabolism [52] is expressed in breast cancer cell lines [53]. In addition to the activation of genes involved in fatty acid catabolism, PPAR- α regulates also the expression of genes controlling the cell proliferation [54]. Indeed, PPAR- α agonists exert an anti-proliferative effect *in vitro* against breast cancer cell lines [55,56]. At the tumor level, gene expression of PPAR- α was reduced in the HC group compared to the control one suggesting that, a downregulation of tumor PPAR- α by the HC diet could contribute to the enhanced tumor growth.

Tumor of mice fed the HC diet over-expressed enzymes mRNA involved in glycolysis (*HK2*, *PFKFB3* and *PFKFB4*) and down-expressed genes of citrate cycle actors (*SDHB* and *IDH-3 α*). Enhanced uptake of glucose with lactate production even under normal oxygen conditions is known as the Warburg effect [57]. This aerobic glycolysis plays an important role in the tumor development by remodeling the metabolic profile, which allows tumor cell survival under adverse conditions [58,59]. Therefore, a higher Warburg effect in tumors of mice fed HC diet could contribute to the increased proliferation of these tumors. Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) has been shown to be involved in the Warburg effect of breast cell lines including MCF-7 [60] but hypoxia is a late-occurring event which is not the main actor in the switch to aerobic glycolysis [61]. Tumor *HIF-1 α* mRNA expression was lower in the HC fed group than in the control one suggesting that hypoxia could be reduced. Because gene expression of *VEGFR2* was increased in tumor of HCT group, we can speculate that hypoxia was reduced in HCT tumors as a result of an enhanced angiogenesis. Indeed, HC diets have

been shown to stimulate breast tumor angiogenesis [10,11]. β -catenin has a dual function in tumor cells: in addition to act as a transcriptional factor *via* the Wnt signaling pathway [62], β -catenin is also an adhesion molecule associated with E-cadherin and actin filaments at the cell membrane [63]. In tumor of mice fed the HC diet, *β -Catenin* mRNA expression was downregulated suggesting that the diet reduced tumor cell adhesion. Among the fatty acids, the docosahexaenoic acid, an n-3 polyunsaturated fatty acid, has been shown to inhibit the protein β -catenin expression in human hepatocellular [64] and colorectal cancer cells [65]. Adiponectin mediates an antiproliferative response in numerous breast cancer cells [43,44]. In our experimental model, the plasma adiponectin level was unchanged whatever the diet and independently of the presence of tumor, however tumor *AdipoR1* mRNA expression was reduced in the HC diet group compared to the control one. So tumors of mice fed the HC diet were less sensitive to adiponectin. Oxidative stress and apoptosis can be induced by decreasing the ability of cell to detoxify reactive oxygen species [66]. Manganese superoxide dismutase (MnSOD), a mitochondrial enzyme encoded by the nuclear *SOD2* gene is involved in the dismutation of the superoxide radical into hydrogen peroxide (H_2O_2) and molecular oxygen (O_2) [67]. Then H_2O_2 is converted to water by several enzymes such as glutathione peroxidase 1 and 2 (GPX-1 and GPX-2) [67]. The HC diet induced the decrease in tumor gene expression of *SOD-2* and *GPX-2* and the increase of tumor *GPX-1* mRNA expression. Low levels of MnSOD correlate to proliferation of non metastatic breast cancer cells, such as MCF-7 [68]. Moreover, deficiency in GPX-2 renders MCF-7 cells sensitive to the oxidative stress-induced apoptosis [69] whereas GPX-1 inhibits apoptosis of breast cancer cell lines [70]. Thus, gene regulation of tumor antioxidant enzymes by the HC diet could explain the higher tumor proliferation compared to the control group.

In an experimental model of a diet-induced obesity, the tumor expression of proteins involved in proliferation (Ki67), survival (Bcl-2) and inflammation (COX-2) was increased [10,71]. In our mice model, independently of the weight gain and tumor gene expression results, the HC diet increased tumor proliferation and decreased apoptosis as shown by Ki67 and active caspase-3 immunostainings, respectively. Moreover, the expression of COX-2, an enzyme involved in the inflammation, tended to increase in tumor of mice fed the HC diet while the one of the IL-1R expression was not altered. The HC diet induced overweight or obesity in mice leads to increased circulating levels of IGF-I [71,72]. Some studies have demonstrated that at the local level a high IGF-I production by the tumor stimulates tumor growth whereas circulating IGF-I levels do not influence cancer progression [73,74]. In this study, the tumor IGF-I gene expression was unchanged whatever the diet, indicating that IGF-I could not contribute the enhanced tumor growth in response to the HC diet.

Obesity resulting from high fat diet feeding and low physical activity is an established risk factor for breast cancer in postmenopausal women in particular for ER⁺ tumors [13,14]. Estrogens are involved in breast carcinogenesis *via* binding and activation of their own receptors. Increasing evidence indicate that the ER- α may be primarily associated with regulation of cell proliferation, while

the ER- β form has been linked with cell apoptosis regulation [75,76]. Additionally, the ER- α /ER- β ratio is elevated in proliferative pre-invasive mammary tumors compared to normal tissues [77]. In the present study, tumor ER- α expression was unchanged whatever the diet whereas ER- β expression was reduced in tumor of mice fed the HC diet. Thus, ER- α /ER- β ratio was higher in tumor of mice fed the HC diet than in the control tumor. So a HC diet without inducing overweight, stimulated ER-positive breast tumor growth by reducing ER- β expression. The expression of another hormonal receptor, the progesterone receptor (PgR), was also reduced in tumor of mice fed HC diet. Both growth-stimulatory and inhibitory actions of progesterone have been reported in cultured breast cancer cells and in animal tumor models [78-80]. In MCF-7 cells, cell proliferation was inhibited by progesterone through PI3-kinase/Akt pathway [81]. Therefore, the HC diet could also increase tumor growth by reducing tumor PgR expression.

In summary, the results of this study demonstrate that a HC diet increased ER⁺ mammary cancer growth in the absence of overweight *via* the tumor overexpression of protein involved in proliferation (Ki67) and the tumor downexpression of protein involved in apoptosis (cleaved caspases 3). The enhanced tumor growth might be associated also to a decrease of NK cell number and function and to an altered tumor gene and hormonal receptor expression. Our results show that a HC diet stimulates ER⁺ breast cancer growth even in an obese resistant experimental model and that suggesting that a reduction of the calorie intake by limiting fat might slow down breast cancer development.

Acknowledgements

The authors thank Pr L. Vicot-Pouget (Laboratoire de Biologie du Tissu Osseux et Contraintes Mécaniques, U890 Inserm, Saint-Etienne) for providing a Piximus apparatus, Pr E. Charaffe-Jaufret (Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille, Marseille) for showing us the orthotopic injection into mammary fat pads, Dr D. Bernard-Gallon (Département d'Oncogénétique du Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand) for the use of Nanodrop spectrophotometer and the ABI Prism 7900HT Sequence Detection System and S. Rougé and K. Combe (Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire et Nutrition, UFR de Pharmacie, Université d'Auvergne Clermont-1) for their technical assistance.

References

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011;61(2):69-90.
2. Bosetti C, Bertuccio P, Levi F, Chatenoud L, Negri E, La Vecchia C. The decline in breast cancer mortality in Europe: an update (to 2009). *Breast* 2012;21(1):77-82.
3. Kohler BA, Ward E, McCarthy BJ et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system. *J Natl Cancer Inst* 2011;103(9):714-736.
4. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010;60(5):277-300.
5. Chia KS, Reilly M, Tan CS et al. Profound changes in breast cancer incidence may reflect changes into a Westernized lifestyle: a comparative population-based study in Singapore and Sweden. *Int J Cancer* 2005;113(2):302-306.
6. Knekt P, Albanes D, Seppanen R et al. Dietary fat and risk of breast cancer. *Am J Clin Nutr* 1990;52(5):903-908.
7. Howe GR, Hirohata T, Hislop TG et al. Dietary factors and risk of breast cancer: combined analysis of 12 case-control studies. *J Natl Cancer Inst* 1990;82(7):561-569.
8. Kim EH, Willett WC, Colditz GA et al. Dietary fat and risk of postmenopausal breast cancer in a 20-year follow-up. *Am J Epidemiol* 2006;164(10):990-997.
9. Lof M, Sandin S, Laggiou P et al. Dietary fat and breast cancer risk in the Swedish women's lifestyle and health cohort. *Br J Cancer* 2007;97(11):1570-1576.
10. Kim EJ, Choi MR, Park H et al. Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant BALB/c mice. *Breast Cancer Res* 2011;13(4):R78.
11. Gu JW, Young E, Patterson SG et al. Postmenopausal obesity promotes tumor angiogenesis and breast cancer progression in mice. *Cancer Biol Ther* 2011;11(10):910-917.
12. Buettner R, Scholmerich J, Bollheimer LC. High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity* 2007;15(4):798-808.
13. Reeves GK, Pirie K, Beral V, Green J, Spencer E, Bull D. Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study. *BMJ* 2007;335(7630):1134.
14. Stephenson GD, Rose DP. Breast cancer and obesity: an update. *Nutr Cancer* 2003;45(1):1-16.
15. Rose DP, Connolly JM, Meschter CL. Effect of dietary fat on human breast cancer growth and lung metastasis in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1991;83(20):1491-1495.
16. Marti A, Marcos A, Martinez JA. Obesity and immune function relationships. *Obes Rev* 2001;2(2):131-140.
17. Lynch LA, O'Connell JM, Kwasnik AK, Cawood TJ, O'Farrelly C, O'Shea DB. Are natural killer cells protecting the metabolically healthy obese patient? *Obesity* 2009;17(3):601-605.
18. O'Shea D, Cawood TJ, O'Farrelly C, Lynch L. Natural killer cells in obesity: impaired function and increased susceptibility to the effects of cigarette smoke. *PLoS One* 2010;5(1):e8660.
19. Nesaretnam K, Radhakrishnan A, Selvaduray KR et al. Effect of palm oil carotene on breast cancer tumorigenicity in nude mice. *Lipids* 2002;37(6):557-560.
20. Gruber TA, Skelton DC, Kohn DB. Requirement for NK cells in CD40 ligand-mediated rejection of Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia cells. *J Immunol* 2002;168(1):73-80.
21. Fearnside JF, Dumas ME, Rothwell AR et al. Phylometabonomic patterns of adaptation to high fat diet feeding in inbred mice. *PLoS One* 2008;3(2):e1668.
22. Olson LK, Tan Y, Zhao Y, Aupperlee MD, Haslam SZ. Pubertal exposure to high fat diet causes mouse strain-dependent alterations in mammary gland development and estrogen responsiveness. *Int J Obes* 2010;34(9):1415-1426.
23. Zimmermann M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 1983;16(2):109-110.
24. Maillard S, Ameller T, Gauduchon J et al. Innovative drug delivery nanosystems improve the anti-tumor activity in vitro and in vivo of anti-estrogens in human breast cancer and multiple myeloma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005;94(1-3):111-121.
25. Martin A, David V, Malaval L, Lafage-Proust MH, Vico L, Thomas T. Opposite effects of leptin on bone metabolism: a dose-dependent balance related to energy intake and insulin-like growth factor-I pathway. *Endocrinology* 2007;148(7):3419-3425.
26. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19(5):403-410.

27. Merlin E, Goncalves-Mendes N, Hannani D et al. Extracorporeal photochemotherapy induces arginase 1 in patients with graft versus host disease. *Transpl Immunol* 2011;24(2):100-106.
28. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004;64(15):5245-5250.
29. Jungblut M, Oeltze K, Zehnter I, Hasselmann D, Bosio A. Preparation of single-cell suspensions from mouse spleen with the gentleMACS Dissociator. *J Vis Exp* 2008(22).
30. Marcelin G, Liu SM, Li X, Schwartz GJ, Chua S. Genetic control of ATGL-mediated lipolysis modulates adipose triglyceride stores in leptin-deficient mice. *J Lipid Res* 2012;53(5):964-972.
31. Vivier E, Raulet DH, Moretta A et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 2011;331(6013):44-49.
32. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 2008;9(5):503-510.
33. Dewan MZ, Terunuma H, Takada M et al. Role of natural killer cells in hormone-independent rapid tumor formation and spontaneous metastasis of breast cancer cells in vivo. *Breast Cancer Res Treat* 2007;104(3):267-275.
34. Screpanti V, Wallin RP, Grandien A, Ljunggren HG. Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. *Mol Immunol* 2005;42(4):495-499.
35. Cousins DJ, Staynov DZ, Lee TH. Regulation of interleukin-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression. *Am J Respir Crit Care Med* 1994;150:S50-53.
36. Nimer SD, Uchida H. Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 expression. *Stem Cells* 1995;13(4):324-335.
37. Zhang AL, Colmenero P, Purath U et al. Natural killer cells trigger differentiation of monocytes into dendritic cells. *Blood* 2007;110(7):2484-2493.
38. Kim KY, Kang MA, Nam MJ. Enhancement of natural killer cell-mediated cytotoxicity by coexpression of GM-CSF/B70 in hepatoma. *Cancer Lett* 2001;166(1):33-40.
39. van den Bosch G, Preijers F, Vreugdenhil A, Hendriks J, Maas F, De Witte T. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) counteracts the inhibiting effect of monocytes on natural killer (NK) cells. *Clin Exp Immunol* 1995;101(3):515-520.
40. Smith AG, Sheridan PA, Harp JB, Beck MA. Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. *J Nutr* 2007;137(5):1236-1243.
41. Lautenbach A, Wrann CD, Jacobs R, Muller G, Brabant G, Nave H. Altered phenotype of NK cells from obese rats can be normalized by transfer into lean animals. *Obesity* 2009;17(10):1848-1855.
42. Nave H, Mueller G, Siegmund B et al. Resistance of Janus kinase-2 dependent leptin signaling in natural killer (NK) cells: a novel mechanism of NK cell dysfunction in diet-induced obesity. *Endocrinology* 2008;149(7):3370-3378.
43. Jarde T, Caldefie-Chezet F, Goncalves-Mendes N et al. Involvement of adiponectin and leptin in breast cancer: clinical and in vitro studies. *Endocr Relat Cancer* 2009;16(4):1197-1210.
44. Jarde T, Perrier S, Vasson MP, Caldefie-Chezet F. Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer. *Eur J Cancer* 2011;47(1):33-43.
45. Furberg AS, Veierod MB, Wilsaard T, Bernstein L, Thune I. Serum high-density lipoprotein cholesterol, metabolic profile, and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 2004;96(15):1152-1160.
46. Kucharska-Newton AM, Rosamond WD, Mink PJ, Alberg AJ, Shahar E, Folsom AR. HDL-cholesterol and incidence of breast cancer in the ARIC cohort study. *Ann Epidemiol* 2008;18(9):671-677.
47. Ray G, Husain SA. Role of lipids, lipoproteins and vitamins in women with breast cancer. *Clin Biochem* 2001;34(1):71-76.
48. Fiorenza AM, Branchi A, Sommariva D. Serum lipoprotein profile in patients with cancer. A comparison with non-cancer subjects. *Int J Clin Lab Res* 2000;30(3):141-145.
49. Jozan S, Faye JC, Tournier JF, Tauber JP, David JF, Bayard F. Interaction of estradiol and high density lipoproteins on proliferation of the human breast cancer cell line MCF-7 adapted to grow in serum free conditions. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;133(1):105-112.
50. Rotheneder M, Kostner GM. Effects of low- and high-density lipoproteins on the proliferation of human breast cancer cells in vitro: differences between hormone-dependent and hormone-independent cell lines. *Int J Cancer* 1989;43(5):875-879.
51. Fagherazzi G, Fabre A, Boutron-Ruault MC, Clavel-Chapelon F. Serum cholesterol level, use of a cholesterol-lowering drug, and breast cancer: results from the prospective E3N cohort. *Eur J Cancer Prev* 2010;19(2):120-125.
52. Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999;20(5):649-688.

53. Suchanek KM, May FJ, Robinson JA et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231. *Mol Carcinog* 2002;34(4):165-171.
54. Peters JM, Aoyama T, Cattley RC, Nobumitsu U, Hashimoto T, Gonzalez FJ. Role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in altered cell cycle regulation in mouse liver. *Carcinogenesis* 1998;19(11):1989-1994.
55. Bocca C, Bozzo F, Martinasso G, Canuto RA, Miglietta A. Involvement of PPARalpha in the growth inhibitory effect of arachidonic acid on breast cancer cells. *Br J Nutr* 2008;100(4):739-750.
56. Avis I, Hong SH, Martinez A et al. Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions. *FASEB J* 2001;15(11):2007-2009.
57. Warburg O. On the origin of cancer cells. *Science* 1956;123(3191):309-314.
58. Buerkle A, Weber WA. Imaging of tumor glucose utilization with positron emission tomography. *Cancer Metastasis Rev* 2008;27(4):545-554.
59. Chandra D, Singh KK. Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2011;1807(6):620-625.
60. Robey IF, Lien AD, Welsh SJ, Baggett BK, Gillies RJ. Hypoxia-inducible factor-1alpha and the glycolytic phenotype in tumors. *Neoplasia* 2005;7(4):324-330.
61. Vander Heiden MG, Cantley LC, Thompson CB. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 2009;324(5930):1029-1033.
62. Brennan KR, Brown AM. Wnt proteins in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2004;9(2):119-131.
63. Daugherty RL, Gottardi CJ. Phospho-regulation of Beta-catenin adhesion and signaling functions. *Physiology* 2007;22:303-309.
64. Lim K, Han C, Dai Y, Shen M, Wu T. Omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit hepatocellular carcinoma cell growth through blocking beta-catenin and cyclooxygenase-2. *Mol Cancer Ther* 2009;8(11):3046-3055.
65. Calviello G, Resci F, Serini S et al. Docosahexaenoic acid induces proteasome-dependent degradation of beta-catenin, down-regulation of survivin and apoptosis in human colorectal cancer cells not expressing COX-2. *Carcinogenesis* 2007;28(6):1202-1209.
66. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 2000;408(6809):239-247.
67. Mates JM. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000;153(1-3):83-104.
68. Kattan Z, Minig V, Leroy P, Dauca M, Becuwe P. Role of manganese superoxide dismutase on growth and invasive properties of human estrogen-independent breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2008;108(2):203-215.
69. Yan W, Chen X. GPX2, a direct target of p63, inhibits oxidative stress-induced apoptosis in a p53-dependent manner. *J Biol Chem* 2006;281(12):7856-7862.
70. Gouaze V, Andrieu-Abadie N, Cuvillier O et al. Glutathione peroxidase-1 protects from CD95-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277(45):42867-42874.
71. Park H, Kim M, Kwon GT et al. A high-fat diet increases angiogenesis, solid tumor growth, and lung metastasis of CT26 colon cancer cells in obesity-resistant BALB/c mice. *Mol Carcinog* 2011.
72. Baur JA, Pearson KJ, Price NL et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 2006;444(7117):337-342.
73. Huang YF, Shen MR, Hsu KF, Cheng YM, Chou CY. Clinical implications of insulin-like growth factor 1 system in early-stage cervical cancer. *Br J Cancer* 2008;99(7):1096-1102.
74. Dearth RK, Kuitatse I, Wang YF et al. A moderate elevation of circulating levels of IGF-I does not alter ErbB2 induced mammary tumorigenesis. *BMC Cancer* 2011;11:377.
75. Hodges-Gallagher L, Valentine CD, El Bader S, Kushner PJ. Estrogen receptor beta increases the efficacy of antiestrogens by effects on apoptosis and cell cycling in breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 2008;109(2):241-250.
76. Acconcia F, Totta P, Ogawa S et al. Survival versus apoptotic 17beta-estradiol effect: role of ER alpha and ER beta activated non-genomic signaling. *J Cell Physiol* 2005;203(1):193-201.
77. Roger P, Sahla ME, Makela S, Gustafsson JA, Baldet P, Rochefort H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Res* 2001;61(6):2537-2541.
78. Conneely OM, Jericevic BM, Lydon JP. Progesterone receptors in mammary gland development and tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003;8(2):205-214.
79. Lin VC, Eng AS, Hen NE, Ng EH, Chowdhury SH. Effect of progesterone on the invasive properties and tumor growth of progesterone receptor-transfected breast cancer cells MDA-MB-231. *Clin Cancer Res* 2001;7(9):2880-2886.

80. van der Burg B, Kalkhoven E, Isbrucker L, de Laat SW. Effects of progestins on the proliferation of estrogen-dependent human breast cancer cells under growth factor-defined conditions. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;42(5):457-465.
81. Alkhalaf M, El-Mowafy A, Karam S. Growth inhibition of MCF-7 human breast cancer cells by progesterone is associated with cell differentiation and phosphorylation of Akt protein. *Eur J Cancer Prev* 2002;11(5):481-488.

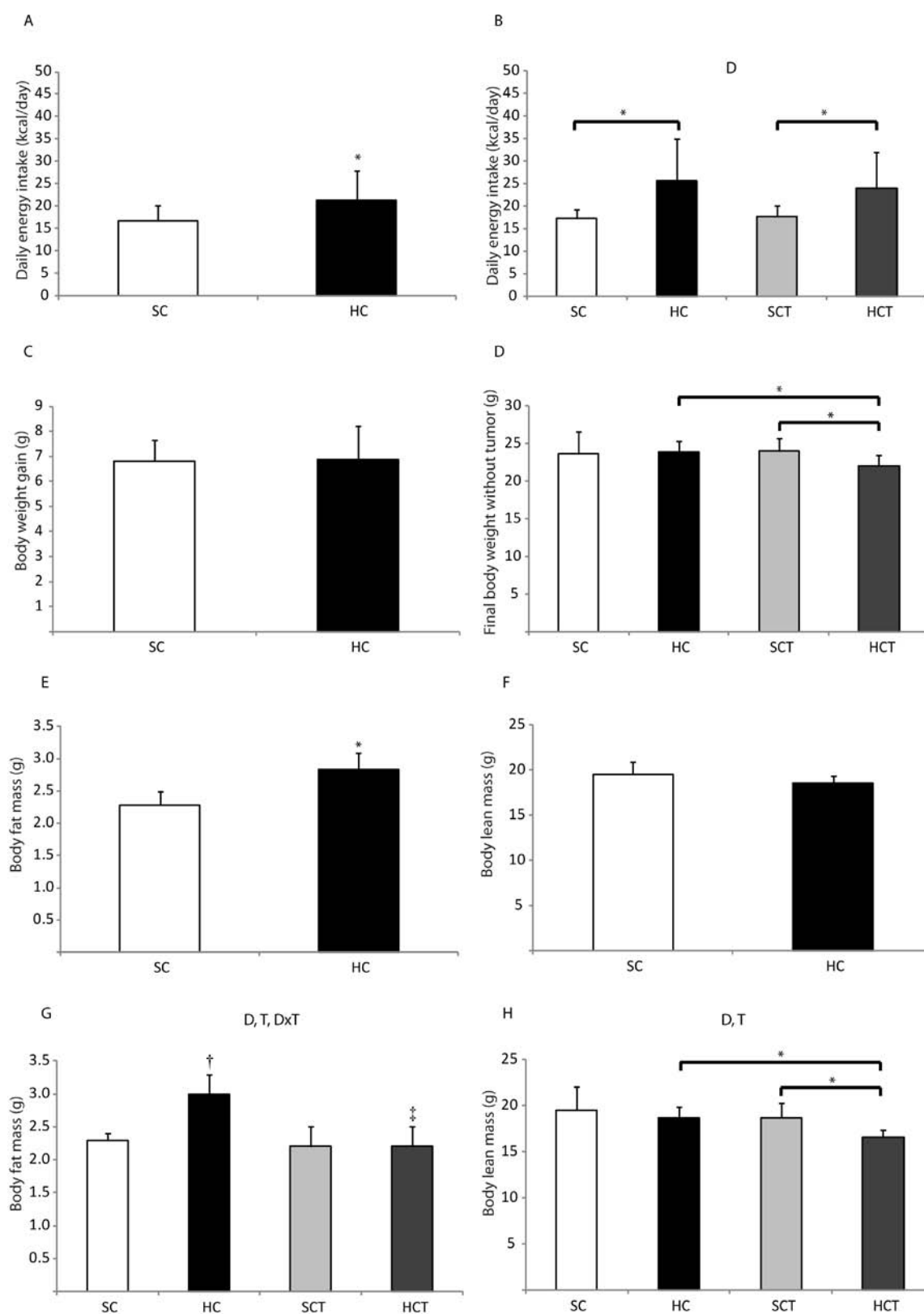


Figure 1. Chronic consumption of a high-calorie diet and tumor growth effects on energy intake, body weight and composition. Four-week old, female BALB/c nu/nu athymic mice were fed on a standard (SC) or a high-caloric (HC) diet for a period of 5 months. Five months after initiating

feeding, MCF-7 cells (2×10^6 cells suspended in 200 μ L Matrigel) or Matrigel were injected into each of fourth mammary fat pad of mice. The mice remained on the same diets. One month after tumor cell implantation, the mice were sacrificed. Food intake and body weights were measured throughout study. Body fat and lean masses were determined by dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA) before MCF-7 cells implantation and at the end of the experimentation.

Energy intakes before (A) and after (B) tumor implantation. Body weight gain after 5 months of HC diet (C) and body weight without tumor at the end of investigation (C). Body fat (E) and lean masses (F) after 5 months of SC or HC diet. Body fat (G) and lean masses (H) 1 month after MCF-7 cells or Matrigel injections. Results are means \pm SE. For energy intake and body weight measurements $n=10$ in SC group and $n=18$ in HC group before injections and $n=5$ for SC, $n=9$ for HC, $n=5$ for SCT and $n=9$ for HCT after tumor implantation. For body composition assessment, $n=5$ in each group. Letters above the graphs indicate an effect of the type of diet (D), the tumor (T) or an interaction between diet and tumor (DxT) ($p<0.05$, 2-way ANOVA). In case of interaction, individual means were compared with a least significant difference (LSD) post hoc test; different from control mice (SC or HC), ‡ $p<0.05$; different from mice fed SC diet, † $p<0.05$. In experiments with only two sets of data or in absence of interaction, the statistical analysis was performed by Mann-Whitney test, * $p<0.05$.

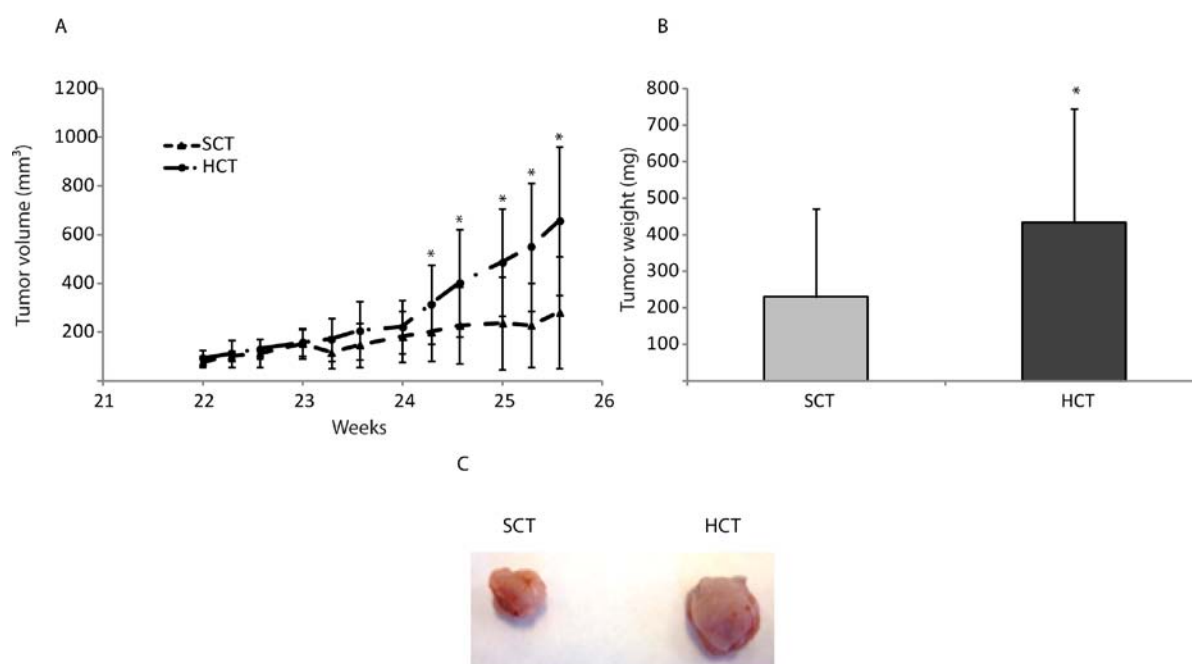


Figure 2. A high-calorie diet stimulates tumor growth in BALB/c nu/nu athymic mice. Four-week old, female BALB/c nu/nu athymic mice were fed on a standard or a high-calorie diet and MCF-7 cells (2×10^6 cells suspended in 200 μ L Matrigel) or Matrigel were injected into each of fourth mammary fat pad of mice after 5 months of feeding. The mice were fed continuously on the same diets. Tumor size was monitored three times a week by measuring the anteroposterior diameter with calipers and calculated *via* the formula: $1/2 \times \text{long diameter} \times \text{short diameter}^2$. One month after injections all the mice were sacrificed. The tumors were removed from mice and weighed. Tumor volume evolution over time (A). Tumor weight at the end of investigations (B). Image of tumor isolated from SCT and HCT mice (C). Results are means \pm SE ($n=12$ for SCT and $n=14$ for HCT). The statistical analysis was performed by Mann-Whitney test, SCT \neq HCT, * $p<0.05$.

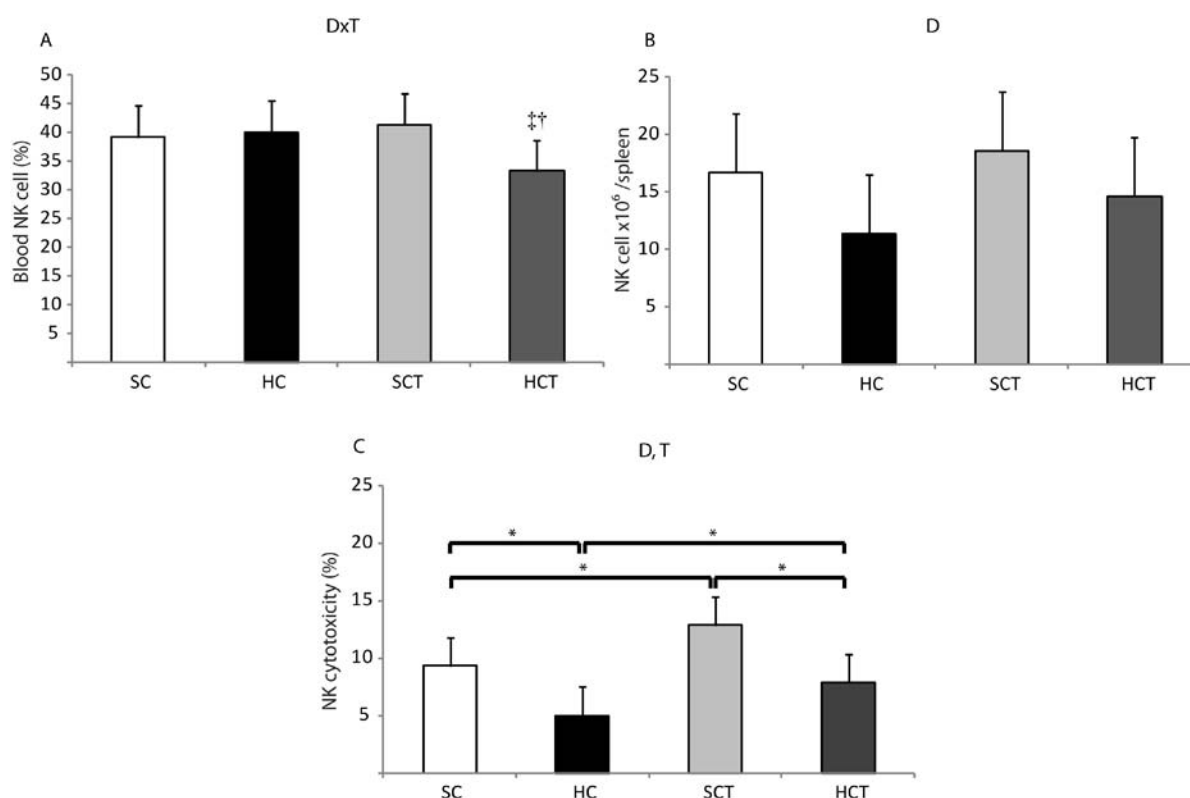


Figure 3. Effects of a high-calorie diet on the NK cell number and function. Six months after initiating feeding, blood was collected by cardiac puncture and spleens were dissociated in single-cell suspensions. Percentage of circulating NK cell and number of NK in splenic single-cell suspensions were determined by flow cytometry using an antibody anti-CD49b. Percentage of NK cells in blood (A). Number of splenic NK cells (B). Splenic NK cells were isolated and incubated with YAC-1 cells labeled with CFSE for 4 h at different effector-to-target ratio 50:1. The lytic activity of splenic NK cell against the YAC-1 cells was evaluated by flow cytometry using PI staining. Cytotoxicity of splenic NK cells (C). Results are means \pm SE (n=5 for SC, n=9 for HC, n=5 for SCT and n=9 for HCT). Letters above the graphs indicate an effect of the type of diet (D), the tumor (T), or an interaction between diet and tumor (DxT) ($p < 0.05$, 2-way ANOVA). In case of interaction, individual means were compared with least significant difference (LSD) post hoc test; different from control mice (SC or HC), \ddagger $p < 0.05$; different from mice fed SC diet, \dagger $p < 0.05$. In experiments with only two sets of data or in absence of interaction, the statistical analysis was performed by Mann-Whitney test, * $p < 0.05$.

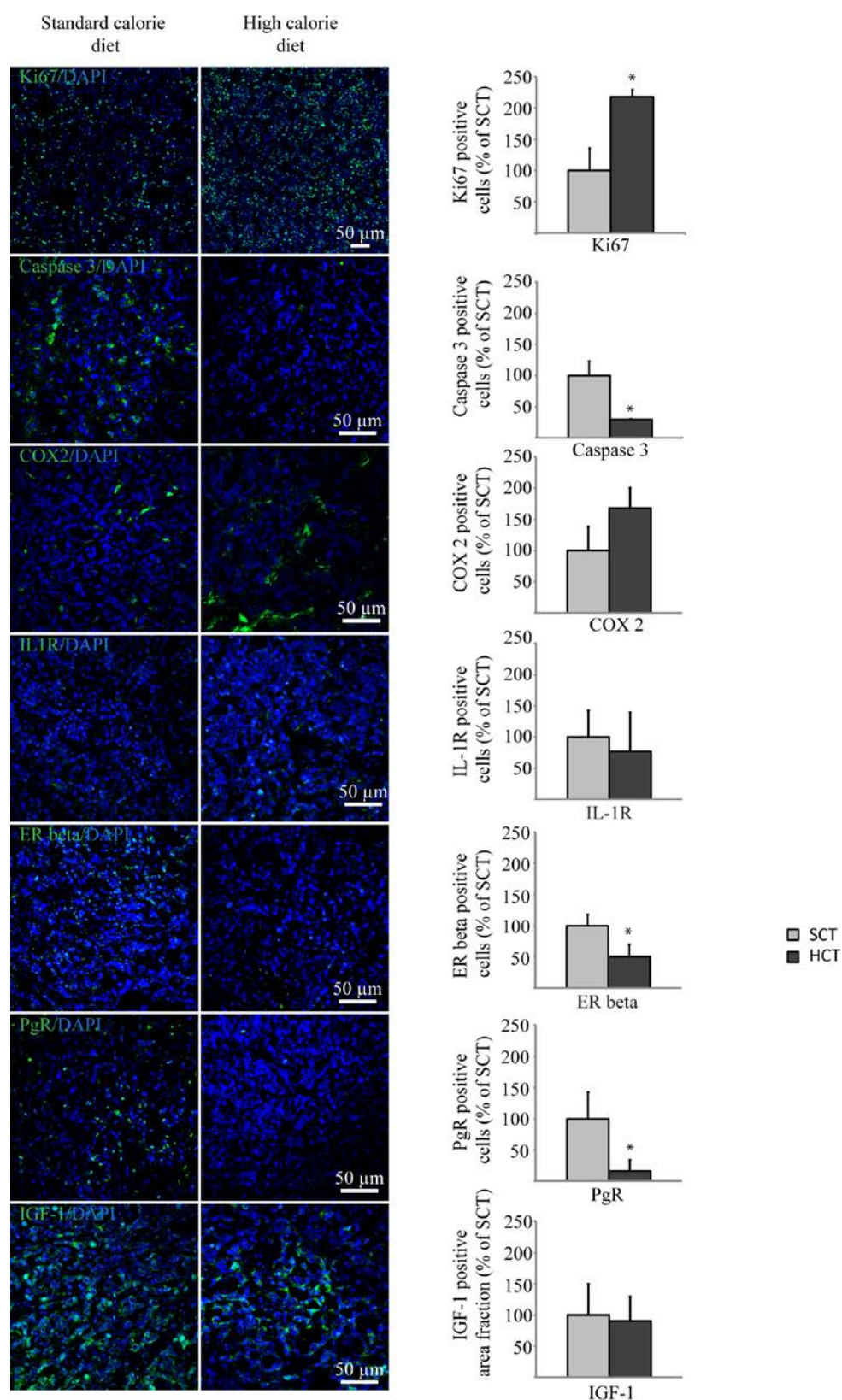


Figure 4. Effects of a high-calorie diet on the tumor expression of protein involved in proliferation, apoptosis and endocrine receptors. Tumor sections were stained with antibody raised against cleaved caspases 3, Ki67, COX-2, IL-1R, ER β , PgR, IGF-1 and IGF-1R (green) and nuclei

were stained with DAPI (blue). Representative merged images of immuno-fluorescence analysis were shown on the left. ImageJ quantifications of the number of fluorescent cell or the proportion of area fluorescent are shown on the right. Results are means \pm SE (n=3 for SCT (standard-calorie diet and tumor) and n=3 for HCT (high-calorie diet and tumor). The statistical analysis was performed by Mann-Whitney test, * $p < 0.05$.

Table 1: Plasma parameters in different groups after 6 months of SC and HC diet

	SC	HC	SCT	HCT	
Total proteins (g/L)	38.6 ± 2.9	36 ± 2.7	36.7 ± 3.5	37.7 ± 2.5	
Albumin (g/L)	14.1 ± 3.5	14.3 ± 3.6	13.0 ± 3.1	12.7 ± 2.5	
ALP (UI/L)	169 ± 63	160 ± 37	221 ± 48	144 ± 36*	D
ALT (UI/L)	17 ± 9	19 ± 7	17 ± 9	17 ± 6	
Creatinine (μM)	20.0 ± 3.0	19.5 ± 3.4	17.3 ± 3.1	16.4 ± 5.0	
Glucose (mM)	8.2 ± 4.3	8.4 ± 1.8	4.6 ± 1.5	7.0 ± 2.6	T
Triglycerides (mM)	0.50 ± 0.16	0.40 ± 0.19	0.34 ± 0.13	0.30 ± 0.18	
NEFA (mM)	0.52 ± 0.17	0.62 ± 0.24	0.47 ± 0.24	0.44 ± 0.35	
Total cholesterol (mM)	2.12 ± 0.29	2.41 ± 0.35	1.56 ± 0.34‡	2.78 ± 0.40‡†	D, DxT
Cholesterol HDL (mM)	1.79 ± 0.14	2.21 ± 0.35†	1.26 ± 0.28‡	2.34 ± 0.34†	D, DxT
Cholesterol LDL (mM)	0.25 ± 0.11	0.26 ± 0.12	0.22 ± 0.13	0.38 ± 0.15	
Leptin (pg/mL)	20.8 ± 12.9	14.9 ± 6.7	17.5 ± 7.2	16.0 ± 9.8	
Adiponectin (μg/mL)	25.7 ± 11.5	20.3 ± 4.0	15.5 ± 10.0	18.3 ± 4.4	
GM-CSF (pg/mL)	18.7 ± 5.3	12.9 ± 4.3	32.7 ± 15.3	13.5 ± 6.9*	D, T
Rantes (pg/mL)	13.9 ± 7.2	13.2 ± 8.8	13.9 ± 7.3	18.3 ± 9.4	
VEGF (pg/mL)	33.5 ± 7.3	31.6 ± 4.8	35.8 ± 4.8	36.2 ± 9.7	

Results are means ± SE, (n=5 for SC ; n=9 for HC ; n=5 for SCT and n=9 for HCT); SC, standard-calorie diet; HC, high-calorie diet; SCT, standard-calorie diet and tumor; HCT, high-calorie diet and tumor; D, diet; T, tumor; DxT, interaction between diet and tumor; ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine aminotransferase; NEFA, nonesterified fatty acids; HDL, high density lipoprotein; LDL, low density lipoprotein; GM-CSF, granulocyte macrophage colony stimulating factor; VEGF, vascular endothelial growth factor. Blood was drawn in fasted state. Letters indicate an effect of T, the type of D, or DxT (p<0.05, 2-way ANOVA). In case of interaction, symbols indicate statistical significance between groups [p<0.05, least significant difference (LSD) post hoc test]. ‡Different from control mice (NC or HC); † different from mice fed SC diet. In absence of interaction, Mann-Whitney test was realized and symbols indicate significance between groups; SC ≠ HC, ◇ p<0.05; SCT ≠ HCT, * p <0.05; HC ≠ HCT, □ p<0.05; SC ≠ SCT, • p<0.05.

Table 2: Effects of HC diet on mRNA expression in mammary tumors.

Genes	Assay ID	Fold changes	
		SCT (n=3)	HCT (n=3)
Adiponectin metabolism			
<i>AdipoR1</i>	ADIPOR1-Hs00360422_m1	1 ± 0,12	0,76 ± 0,06*
Angiogenesis			
<i>HIF-1α</i>	HIF1A-Hs00153153_m1	1 ± 0,05	0,54 ± 0,07*
<i>VEGFR2</i>	KDR-Hs00911708_m1	1 ± 0,16	8,51 ± 2,41*
Apoptosis			
<i>Fas</i>	FAS-Hs00163653_m1	1 ± 0,03	0,54 ± 0,15*
<i>TRADD</i>	TRADD-Hs00601065_g1	1 ± 0,33	2,62 ± 0,48*
Cell to cell			
<i>β-Catenin</i>	CTNNB1-Hs00170025_m1	1 ± 0,01	0,77 ± 0,12*
Citrate cycle			
<i>IDH-3α</i>	IDH3A-Hs01051668_m1	1 ± 0,04	0,69 ± 0,02*
<i>SDHB</i>	SDHB-Hs01042478_g1	1 ± 0,02	0,71 ± 0,16*
Glycolyse			
<i>HK2</i>	HK2-Hs00606086_m1	1 ± 0,09	1,69 ± 0,39*
<i>PFKFB2</i>	PFKFB2-Hs00359506_g1	1 ± 0,02	0,65 ± 0,18*
<i>PFKFB3</i>	PFKFB3-Hs00190079_m1	1 ± 0,14	2,73 ± 0,81*
<i>PFKFB4</i>	PFKFB4-Hs00190096_m1	1 ± 0,53	5,66 ± 1,01*
Lipid metabolism			
<i>PPAR-α</i>	PPARA-Hs00231882_m1	1 ± 0,04	0,47 ± 0,12*
Oncogene			
<i>c-Myc</i>	MYC-Hs99999003_m1	1 ± 0,15	0,67 ± 0,09*
Oxidative stress			
<i>GPX-1</i>	GPX1-Hs00829989_gH	1 ± 0,41	6,55 ± 0,14*
<i>GPX-2</i>	GPX2-Hs01591589_m1	1 ± 0,15	0,47 ± 0,20*
<i>SOD-2</i>	SOD2-Hs00167309_m1	1 ± 0,11	0,63 ± 0,20*
Proliferation			
<i>CDK2</i>	CDK2-Hs01548894_m1	1 ± 0,10	0,70 ± 0,12*
<i>p27</i>	CDKN1B-Hs00153277_m1	1 ± 0,03	0,71 ± 0,13*
Tumor suppressor gene			
<i>PTEN</i>	PTEN-Hs00829813_s1	1 ± 0,69	3,83 ± 1,09*

All values are means ± SE. SCT, standard-calorie diet and tumor; HCT, high-calorie diet and tumor; ID, identification. Fold changes are defined as the ratio of mRNA expression of SCT group tumors, which was set to 1 for HCT conditions. * Fold changes were significantly different from SCT, $p < 0.05$ (Student's t test). Only genes with mRNA expression significantly different were presented.

Supplemental data

Table 1: Effects of HC diet on mRNA expression in mammary tumors.

Genes	Assay ID	Fold changes	
		SCT (n=3)	HCT (n=3)
Adiponectin metabolism			
<i>Adiponectin</i>	ADIPOQ-Hs02564413_s1	-	-
<i>AdipoR2</i>	ADIPOR2-Hs00226105_m1	1 ± 0,32	1,13 ± 0,36
Angiogenesis			
<i>IGF-1</i>	IGF1-Hs01547656_m1	-	-
<i>IGF-1R</i>	IGF1R-Hs00609566_m1	1 ± 0,01	0,81 ± 0,17
<i>MMP2</i>	MMP2-Hs00234422_m1	-	-
<i>MMP9</i>	MMP9-Hs00957555_m1	-	-
<i>VEGFA</i>	VEGFA-Hs99999070_m1	1 ± 0,18	1,07 ± 0,18
<i>VEGFB</i>	VEGFB-Hs00957980_g1	1 ± 0,26	1,60 ± 0,57
<i>VEGFC</i>	VEGFC-Hs01099206_m1	1 ± 0,26	0,75 ± 0,07
<i>VEGFR1</i>	FLT1-Hs01904119_gH	1 ± 0,92	3,21 ± 1,82
Apoptosis			
<i>Bcl-2</i>	BCL2-Hs00153350_m1	1 ± 0,64	0,77 ± 0,25
<i>IFN-γ-R1</i>	IFNGR1-Hs00166223_m1	1 ± 0,33	0,87 ± 0,05
<i>IFN-γ-R2</i>	IFNGR2-Hs00194264_m1	1 ± 0,08	1,09 ± 0,21
<i>M6PR</i>	M6PR-Hs00158987_m1	1 ± 0,02	1,13 ± 0,22
<i>Survivin</i>	BIRC5-Hs00978503_m1	-	-
<i>TRAIL-R1</i>	TNFRSF10A-Hs00269492_m1	1 ± 0,01	0,86 ± 0,16
β-oxidation			
<i>ACSL1</i>	ACSL1-Hs00242530_m1	1 ± 0,06	0,82 ± 0,33
<i>CPT1A</i>	CPT1A-Hs00157079_m1	1 ± 0,03	0,94 ± 0,21
<i>CPT1B</i>	CPT1B-Hs03046298_s1	-	-
<i>CPT2</i>	CPT2-Hs00988962_m1	1 ± 0,02	0,83 ± 0,13
Cell to cell			
<i>CTGF</i>	CTGF-Hs01026927_g1	1 ± 0,05	0,74 ± 0,20
<i>E-cadherin</i>	CDH1-Hs00170423_m1	1 ± 0,1	0,84 ± 0,07
<i>Ezrin</i>	EZR-Hs00185574_m1	1 ± 0,16	0,93 ± 0,15
Glycolysis			
<i>AMPK</i>	PRKAB1-Hs00272166_m1	1 ± 0,22	0,83 ± 0,05
<i>GLUT1</i>	SLC2A1-Hs00197884_m1	1 ± 0,56	1,34 ± 0,24
<i>GLUT2</i>	SLC2A2-Hs00165775_m1	-	-
<i>GLUT3</i>	SLC2A3-Hs00359840_m1	-	-
<i>GLUT5</i>	SLC2A5-Hs00161720_m1	-	-
<i>HK1</i>	HK1-Hs00175976_m1	1 ± 0,08	1,05 ± 0,16
<i>PFKFB1</i>	PFKFB1-Hs00159997_m1	-	-
<i>PKLR</i>	PKLR-Hs00176075_m1	-	-

Hormonal metabolism			
<i>Aromatase</i>	CYP19A1-Hs00240671_m1	-	-
<i>ER-α</i>	ESR1-Hs00174860_m1	1 ± 0,14	1,05 ± 0,16
<i>ER-β</i>	ESR2-Hs00230957_m1	-	-
<i>IR</i>	INSR-Hs00961550_m1	1 ± 0,07	1,49 ± 0,61
<i>PgR</i>	PGR-Hs01556707_m1	1 ± 0,01	0,77 ± 0,20
Inflammatory response			
<i>COX-1</i>	PTGS1-Hs00377721_m1	-	-
<i>COX-2</i>	PTGS2-Hs01573469_m1	-	-
<i>IL-1R</i>	IL1R1-Hs00991002_m1	-	-
<i>IL-6</i>	IL6-Hs00985639_m1	-	-
<i>STAT3</i>	STAT3-Hs01047580_m1	1 ± 0,18	0,98 ± 0,05
<i>TNF-α</i>	TNF-Hs01113624_g1	1 ± 0,43	0,62 ± 0,05
Leptin metabolism			
<i>Leptin</i>	LEP-Hs00174877_m1	-	-
<i>Ob-R</i>	LEPR-Hs00174497_m1	-	-
Lipid metabolism			
<i>PPAR-Δ</i>	PPARD-Hs00987011_m1	1 ± 0,06	1,01 ± 0,17
<i>PPAR-γ</i>	PPARG-Hs01115510_m1	-	-
Lipogenesis			
<i>ACAC-α</i>	ACACA-Hs00167385_m1	1 ± 0,15	1,28 ± 0,11
<i>FABP1</i>	FABP1-Hs00155026_m1	-	-
<i>FABP2</i>	FABP2-Hs00164552_m1	-	-
<i>FABP3</i>	FABP3-Hs00269758_m1	-	-
<i>FABP4</i>	FABP4-Hs00609791_m1	-	-
<i>FABP5</i>	FABP5-Hs02339437_g1	1 ± 0,02	1,06 ± 0,27
<i>FABP6</i>	FABP6-Hs00155029_m1	1 ± 0,11	0,99 ± 0,09
<i>FABP7</i>	FABP7-Hs00361424_g1	-	-
<i>FASN</i>	FASN-Hs00188012_m1	1 ± 0,28	1,17 ± 0,23
Oxidative stress			
<i>GSR</i>	GSR-Hs00167317_m1	1 ± 0,21	0,85 ± 0,14
<i>GPX-4</i>	GPX4-Hs00989766_g1	1 ± 0,09	0,88 ± 0,08
<i>HMOX1</i>	HMOX1-Hs01110251_m1	1 ± 0,31	0,70 ± 0,24
<i>SOD-1</i>	SOD1-Hs00916176_m1	1 ± 0,25	0,79 ± 0,18
Pentose phosphate pathway			
<i>G6PD</i>	G6PD-Hs00166169_m1	1 ± 0,30	1,41 ± 0,36
Proliferation			
<i>Akt1</i>	AKT1-Hs00178289_m1	1 ± 0,18	1,27 ± 0,19
<i>Cyclin A2</i>	CCNA2-Hs00996789_g1	1 ± 0,04	0,77 ± 0,28
<i>Cyclin D1</i>	CCND1-Hs00277039_m1	1 ± 0,02	1,06 ± 0,15
<i>Cyclin G1</i>	CCNG1-Hs00171112_m1	1 ± 0,19	0,71 ± 0,06
<i>IGFBP2</i>	IGFBP2-Hs00167151_m1	1 ± 0,05	1,20 ± 0,12
<i>MAPK</i>	MAPK1-Hs01046830_m1	1 ± 0,08	0,85 ± 0,19

<i>PCNA</i>	PCNA-Hs99999177_g1	1 ± 0,01	0,79 ± 0,20
<i>p16</i>	CDKN2A-Hs00923894_m1	-	-
<i>p21</i>	CDKN1A-Hs00355782_m1	1 ± 0,01	0,71 ± 0,21
<i>TGF-β1</i>	TGFB1-Hs00998133_m1	1 ± 0,25	1,11 ± 0,20
Tumor supressor genes			
<i>BRCA1</i>	BRCA1-Hs01556194_m1	1 ± 0,28	0,77 ± 0,08
<i>p53</i>	TP53-Hs01039245_m1	1 ± 0,55	0,97 ± 0,16

All values are means ± SE. SCT, standard calorie diet and tumor; HCT, high-calorie diet and tumor; ID, identification. Fold changes are defined as the ratio of mRNA expression of SCT group tumors, which was set to 1 for HCT conditions. * Fold changes were significantly different from SCT, $p < 0.05$ (Student's t test). Genes without values were not amplified or showed Ct values too high (> 40 Ct) to be considered.

Etude n°2

Effets *in vitro* de concentrations élevées de leptine sur les capacités prolifératives, métaboliques et fonctionnelles des cellules NK-92

Bruno Lamas, Nicolas Goncalves-Mendes, Rachida Nachat-Kappes, Adrien Rossary, Florence Caldefie-Chezet, Marie-Paule Vasson and Marie-Chantal Farges

Journal of Cellular Physiology - Soumise

Présentation de l'étude n°2

Introduction

La leptine est une adipokine impliquée dans le métabolisme énergétique et le contrôle de l'appétit. Elle participe également au développement tumoral et à la modulation des cellules immunocompétentes. L'adipocyte représente la composante cellulaire majoritaire du stroma mammaire et l'hyperleptinémie associée à l'obésité est positivement corrélée au risque de développer un cancer mammaire chez la femme ménopausée. Les cellules Natural Killer (NK) sont des acteurs majeurs de l'immunité anti-tumorale et l'obésité est associée à une diminution du nombre et de la cytotoxicité de ces cellules.

But de l'étude

Le but de cette étude est de déterminer, *in vitro*, les effets de la leptine, sur la fonctionnalité des cellules NK-92. Dans un premier temps, nous avons évalué l'impact de fortes doses de leptine dont celle retrouvée en situation d'obésité sur la prolifération et l'activité métabolique des cellules NK-92 ainsi que sur leur cytotoxicité vis-à-vis de différentes lignées cancéreuses mammaires. Dans un deuxième temps, nous avons recherché les différents effecteurs de la cytotoxicité des cellules NK modulés par la leptine en concentration élevée.

Matériels et Méthodes

Les cellules NK-92 ont été cultivées pendant 48h en présence de concentrations variables de leptine (0 ; 10 (physiologie) ; 100 (obésité) et 200 (pharmacologique) ng/mL). La prolifération et la viabilité des cellules NK-92 ont été déterminées par exclusion au bleu Trypan et leur activité métabolique a été évaluée par le test à la résazurine. La production intracellulaire d'IFN- γ et la cytotoxicité des cellules NK-92 vis-à-vis de différentes cibles (K562 (lignée érythroleucémique humaine), MDA-MB-231 (adénocarcinome mammaire humain, ER⁻) et MCF-7 (adénocarcinome mammaire humain, ER⁺)) ont été quantifiées par cytométrie en flux. Les expressions génique et protéique des effecteurs cytotoxiques (granzyme B, perforine, TRAIL et Fas-L) et du récepteur de la leptine (Ob-R) ont été déterminées par RT-qPCR et western blot.

Résultats majeurs

La leptine, à fortes doses, réduit l'expression génique d'Ob-R. Toutefois, le taux protéique de ce récepteur est inchangé quelle que soit la concentration de leptine testée. Dans nos conditions expérimentales, la leptine accroît l'activité métabolique des cellules NK-92, de façon dose-dépendante, alors que la distribution dans le cycle cellulaire, la prolifération et la viabilité de ces

cellules ne sont pas modifiées. Les fortes concentrations de leptine stimulent la cytotoxicité des cellules NK-92 vis-à-vis des cellules cibles K562 et MDA-MB-231 et à l'inverse, réduisent l'activité lytique de ces cellules vis-à-vis de cellules cibles MCF-7. A la concentration de 100 ng/mL, la leptine stimule l'expression de TRAIL et inhibe celle de la perforine dans les cellules NK-92. La proportion de cellules NK-92 exprimant l'IFN- γ est également augmentée pour des concentrations de 100 et 200 ng/mL de leptine.

Conclusion

La leptine à la concentration observée en situation d'obésité stimule l'activité métabolique des cellules NK-92, accroît l'expression de TRAIL et de l'IFN- γ et réduit celle de la perforine. Ainsi, la cytotoxicité des cellules NK-92 varie selon la sensibilité des cellules cibles à ses effecteurs.

Ces données, *in vitro*, contribuent à mieux comprendre les effets de la leptine dans les défenses immunitaires anti-tumorales. La leptine *via* son impact sur les cellules NK pourrait favoriser le développement de tumeurs hormono-dépendantes non invasives et limiter la croissance des tumeurs hormono-indépendantes invasives.

Publication n°2

Leptin modulates dose-dependently the metabolic and cytolytic activities of NK-92 cells

Bruno Lamas^{1*}, Nicolas Goncalves-Mendes¹, Rachida Nachat-Kappes¹, Adrien Rossary¹, Florence Caldefie-Chezet¹, Marie-Paule Vasson^{1,2} and Marie-Chantal Farges¹

¹Clermont Université, Université d'Auvergne, Unité de Nutrition Humaine, Equipe ECRIN, CLARA, CRNH Auvergne; INRA, UMR 1019, UNH, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France, ²Centre Jean Perrin, Unité de Nutrition, F-63000 Clermont-Ferrand, France

***Correspondence to:** Bruno Lamas, Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire et Nutrition, UFR Pharmacie, 28 place Henri Dunant BP 38, 63001 Clermont-Ferrand cedex 1, France. Phone: +33 4 73 17 80 49; Fax: +33 4 73 17 80 38. E-mail: bruno.lamas@u-clermont1.fr

Abstract

Leptin, a hormone-cytokine produced primarily in the adipose tissue, has pleiotropic effects on many biological systems and in several cell types, including the immune cells. Hyperleptinemia is associated with immune dysfunction and carcinogenesis. Natural killer cells (NK) are critical mediators of anti-tumor immunity, and leptin receptor deficiency in mice leads to impaired NK function. It was thus decided to explore the *in vitro* effects of leptin on human NK cell function. NK-92 cells were cultured during 48 h with different leptin concentrations (absence, 10 (physiological), 100 (obesity) or 200 ng/mL (pharmacology)). Their mitochondrial metabolic activity was assessed using the resazurin test. NK-92 cell cytotoxicity and intracellular IFN- γ production were analyzed by flow cytometry. NK-92 cell mRNA and protein expression levels of cytotoxic effectors were determined by RT-qPCR and western blot. In our experimental conditions, leptin exerted a dose-dependent stimulatory effect on NK-92 cell metabolic activity. In addition, high leptin concentrations enhanced NK-92 cell cytotoxicity against K562-EGFP and MDA-MB-231-EGFP target cells and inversely reduced cytotoxicity against the MCF-7-EGFP target. At 100 ng/mL, leptin upregulated both NK cell granzyme B and TRAIL protein expressions and concomitantly downregulated perforin expression without affecting Fas-L expression. In response to PMA/ionomycin stimulation, the proportion of IFN- γ expressing NK-92 cells increased with 100 and 200 ng/mL of leptin. In conclusion, leptin concentration at obesity level variably increased NK-92 cell metabolic activity and modulated NK cell cytotoxicity according to the target cells. The underlying mechanisms are partly due to an up-regulation of TRAIL and IFN- γ expression and a down-regulation of perforin.

Introduction

Adipose tissue not only plays an important role as an energy storage site, but also modulates immune cells through the release of adipokines, such as leptin, resistin, adiponectin and cytokines i.e. interleukin-6 and tumor necrosis factor (TNF)- α (Tilg and Moschen, 2006). Leptin is the most widely studied adipocyte-derived hormone for which production and circulating levels depend on body mass index (Maffei et al., 1995). Ob-R, the functional receptor of leptin, is expressed both in the hypothalamus, where leptin regulates energy homeostasis and neuroendocrine function, and in cell types, in particular in immune cells (Matarese et al., 2005). Several meta-analyses have shown an association between high body mass index and an increased incidence of various types of cancer (Calle and Kaaks, 2004; Renehan, 2010), including breast malignancies in postmenopausal women (Grossmann et al., 2010). Among the mechanisms involved in cancer development, leptin could act as a growth-promoting factor (Grossmann et al., 2010). Leptin receptors are expressed in different breast cancer cell lines, including MCF-7, MDA-MB-231 and T47D (Jarde et al., 2009; Ray et al., 2007), and also in human breast tumor tissues (Jarde et al., 2009; Jarde et al., 2011). The pro-carcinogenic effect of leptin results not only from cell cycle up-regulation (Ray et al., 2007; Saxena et al., 2007) but also from down-regulation of the apoptotic response (Jarde et al., 2009; Nkhata et al., 2009).

Leptin modulates both innate and adaptive immune responses whatever the physiological and pathological state (Conde et al., 2010). Leptin-deficient ob/ob and leptin receptor-deficient db/db mice displayed marked thymic atrophy and defective immune responses such as reduced macrophage phagocytic activity (Loffreda et al., 1998), decreased lymphocyte proliferation and Th1 cytokine production, and enhanced Th2 cytokine secretion (Lord et al., 1998). In these experimental models, impaired natural killer (NK) cell development and activation has also been reported (Tian et al., 2002).

NK cells belong to the innate immune system and are involved in anti-infectious and anti-tumoral responses (Lanier, 2005; Vivier et al., 2011; Vivier et al., 2008). Target cell recognition by NK involves several mechanisms including the Fc receptor for IgG (CD16) and the natural cytotoxicity receptors NKp44, NKp46 and NKP30 (Lanier, 2005). Additional activating receptors on NK cells, such as NKG2D, also contribute to the spontaneous lytic responses (Lanier, 2005). Killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) bind major histocompatibility complex class I (MHC-I) molecules on target cells, thereby protecting normal endogenous cells from lysis.

NK cells induce cytotoxicity through death ligand-mediated pathways or by releasing cytotoxic granules and proinflammatory cytokines. Perforin and granzyme release requires effector-target cell contact and involves NK cell IFN- γ production and activation of caspases in the target cells (Vivier et al., 2008). IFN- γ controls Th1 differentiation and subsequently regulates the adaptive immune response (Schoenborn and Wilson, 2007). Apoptosis mediated by the TNF- α factor *via* Fas Ligand (Fas-L) and TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) also plays a part in the tumoricidal action of the NK cells (Screpanti et al., 2005; Smyth et al., 2001). Production of IFN- γ and TNF- α by NK

cells is an integral part of the NK effector machinery and synergistically enhances the cytolytic function of NK cells (Wang et al., 2011).

While there is documented evidence of the pro-carcinogenic properties of leptin, little is known about its potential effects on anti-carcinogenic defenses. Hence, the aim of this study was to analyze the effects of leptin on NK cells in terms of metabolic activity, cytotoxicity and the effector molecules involved.

Materials and Methods

NK-92 cell line culture and leptin treatment

The IL-2-dependent human lymphoma cell line NK-92 obtained from American Type Culture Collection (ATCC), is characterized by the absence of KIRs and Fc-receptor (CD16) mediating antibody-dependent cytotoxicity and by a tumor-killing effect *via* cytotoxic effector molecules such as IFN- γ , perforin, granzyme-B and Fas ligand (Tonn et al., 2001). It was cultured under standard conditions (37° C, 5% CO₂, humidified atmosphere) in RPMI 1640 medium (Biowest) supplemented with 100 μ g/mL streptomycin (Sigma), 100 U/mL penicillin (Sigma) and 2 mM glutamine (Sigma). The RPMI medium was supplemented with 10% of fetal calf serum (FCS) (Biowest), 1 mM sodium pyruvate (Sigma) and 200 U/mL of human rIL-2 (eBioscience). For each assay, NK-92 cells were harvested at the logarithmic phase of growth.

NK cells were cultured from 24 to 96 h with or without human recombinant leptin (R&D) at physiological (10 ng/mL), obese (100 ng/mL) or pharmacological (200 ng/mL) concentrations.

Confocal laser scanning microscopy

NK cells cultured without leptin were fixed and permeabilized using an IntraPrep Fix/Perm kit (Beckman Coulter). They were stained firstly with primary antibody anti-Ob-R (R&D) (100 μ g/mL), an antibody that recognizes all the isoforms (Ob-Rt), diluted in phosphate buffer saline (PBS), and secondly with donkey anti-goat alexa fluor 555 (Invitrogen) diluted at 1:300 in PBS 3% bovine serum albumin (BSA). Thereafter nuclei were stained with 4,6-diamidino-2phenolindole (DAPI) (0.5ng/mL) (Sigma). Cells were mounted in Mowiol 4-88 (Calbiochem) and confocal laser-scanning microscopy was performed with the Leica TCS SP5 MP confocal and multiphoton microscope system, equipped with 405 nm, 488 nm and 594 nm lasers and immersion lenses HC PL APO 20 \times 0.7 IMM, HCX PL APO 40 \times 1.25 Oil and HCX PL APO 63 \times 1.4 Oil (Leica). Digital images were prepared using Leica LAS-AF Lite and Adobe Photoshop CS2 software.

RT-qPCR

After 48 h of culture in absence or presence of leptin (10, 100 and 200 ng/mL), NK cells (1 \times 10⁶/ml) were harvested, and total RNA was isolated with TRIzol® Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed with 1 μ g of total RNA, giving rise to 20 μ L of cDNA, as previously reported (Merlin et al., 2011). Primers for Ob-R, perforin, granzyme B, IFN- γ , Fas-L and TRAIL are given in Table 1.

One μ L was used for the PCR performed in real-time on a LightCycler Instrument (Roche Diagnostics). Each transcript was assayed in triplicate and normalized to 18S housekeeping gene. For relative quantification, the comparative CT method, based on the formula $2^{-\Delta\Delta CT}$, was used with the amount of treated sample with 10 ng/mL of leptin.

Western blot analysis

NK cells (1×10^6 /ml) exposed for 48h with or without leptin (10, 100 and 200 ng/mL) were washed twice with ice-cold PBS and lysed with RIPA buffer (Sigma) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (Sigma) for 30 min. The insoluble protein lysate was removed by centrifugation at 14000g for 15 min at 4° C. The protein concentrations were determined using BCA protein assay kit (Interchim). Equal amounts of proteins were resolved on 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (Whatman). After blocking with 5% (w:v) nonfat milk and washing with Tris buffer saline-tween solution (TBST), membranes were incubated with primary antibodies (Abcam): rabbit polyclonal antibody against granzyme B (1:1,000), Fas-L (1:500) and β -actin (1:1,000) or with mouse monoclonal antibody against clone B-D48 (1:1,000; anti-perforin), clone LPR-02 (1:2,000 anti-Ob-Rt) and clone 55B709.3 (1:500; anti-TRAIL). The secondary antibody was horseradish-peroxidase-coupled goat anti-rabbit immunoglobulin (IgG; 1:1,500; Thermo scientific) or goat anti-mouse immunoglobulin (IgG; 1:10,000; Eurobio). The blots were then incubated with secondary antibody for 1h. After washing with TBST three times, signals were detected with ECL plus chemiluminescence kit (GE Healthcare Life Sciences) on ChemiDoc XRS+ (BioRad) and quantified with Image Lab 2.0.1 software (BioRad).

NK cell metabolic activity assay

NK cells were cultured from 24 to 96 h with or without recombinant human leptin (R&D) at physiological (10 ng/mL), obese (100 ng/mL) or pharmacological (200 ng/mL) concentrations. The NK cellular anabolic response to leptin treatment was assessed by the resazurin-based test, as previously described (Czekanska, 2011; O'Brien et al., 2000). Resazurin, blue and non fluorescent, is reduced to resofurin, pink and highly fluorescent, *via* the action of enzymes within viable cells (i.e. dihydrolipoamine dehydrogenase, NAD(P)H quinone oxidoreductase, flavin reductase, NADH dehydrogenase). These enzymes are widely distributed, being found in many species from bacteria to mammals, where they can be either mitochondrial or cytoplasmic (O'Brien et al., 2000). This resazurin test is an indicator of the cell's energy metabolism (Magnani and Bettini, 2000). Briefly, every 24h for 4 days and at each leptin concentration tested, 200 μ l of NK-92 cells (1×10^5 cells) were removed and placed in flat-bottomed 96-well NUNC culture plates (Greiner bio-one) in triplicate cultures. Resazurin (Sigma-Aldrich), dissolved in PBS (pH 7.4, 1.25 mg/ml), was added to the cellular suspension at a final concentration of 25 μ g/ml. Following 2h of incubation under standard conditions, fluorescence excitation was exerted at 530 nm and emission was recorded at 590 nm (Fluoroskan Ascent SL, Dermo Electron Corporation).

Cell cycle and proliferation assays

NK-92 cells previously treated with or without leptin from 24h to 96h, were washed with PBS and fixed with 80% ice-cold ethanol at 4°C overnight. After two washes with PBS, cells were stained with a solution containing 6.5 µg/ml of propidium iodide (Sigma-Aldrich) and 100 µg/ml RNase A (Invitrogen) for 30 min in the dark. The stained cells were analyzed by flow cytometry (Coulter Epics XL flow cytometry system equipped with an argon laser (excitation at 488 nm) and interfaced to System II software (Beckman Coulter)). Cell proliferation and viability were controlled using the trypan blue (0.4%) exclusion test. Proliferation was assessed as the number of living cells counted microscopically and viability was expressed as the percentage of viable cells among the total number.

Cytotoxicity assays

Cell-mediated lytic activity was performed using three human target tumor cell lines from ATCC: K562 (erythroleukemia), MCF-7 (human mammary adenocarcinoma, ER+, HER2+) and MDA-MB-231 (human breast cancer cells, ER-, HER2-). These cell lines were stably transfected by EGFP as previously reported (K562-EGFP (Kantakamalakul et al., 2003), MCF-7-EGFP and MDA-MB-231-EGFP (El Guerrab et al., 2011)) and maintained in RPMI-1640 medium supplemented with FCS either at 10% (MCF-7-EGFP and K562-EGFP) or at 15% (MDA-MB-231-EGFP). The anti-tumor efficacy of NK cells was assessed in flat-bottomed 96-well culture plates, in triplicate for each condition using an effector:target cell ratio of 5:1.

Adherent MCF-7-EGFP and MDA-MB-231-EGFP were first incubated for 24h to stick to the plate and then NK-92 cells, previously cultured in presence of leptin at different concentrations (absence, 10, 100 and 200 ng/mL), were added at the effector/ target cell ratio of 5/1 for 12h. When the K562-EGFP cells were used as target cells, they were co-cultured with NK-92 cells for 4h as previously reported (Allegra et al., 2006).

Subsequently, to remove the cell mixture, adherent MCF-7-EGFP and MDA-MB-231-EGFP cells and NK-92 cells were recovered after accutase (1X) treatment (Millipore). No treatment was necessary for K562-EGFP cells. The cell mixtures were then stained with 10 µl of propidium iodide (250 µg/mL). The number of EGFP-labeled target cells that were killed was determined by analyzing EGFP and PI double-positive cells (emission at 509 and 625 nm, respectively) by flow cytometry. The percent cytotoxicity was calculated with the following equation: % cytotoxicity = $[(\% \text{ EGFP}^+ \text{PI}^+ \text{ targets}) - (\% \text{ spontaneous EGFP}^+ \text{PI}^+ \text{ targets})] / [100 - (\% \text{ spontaneous EGFP}^+ \text{PI}^+ \text{ targets})] \times 100$.

IFN-γ production

NK cell intracellular production of IFN-γ was determined in response to stimulation. Briefly, NK-92 cells were cultured with various concentrations of leptin (0, 10, 100 and 200 ng/ml) for 48 h and subsequently stimulated at 37°C for 4 h by a cocktail of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA;

0.2 µg/mL, Sigma) and ionomycin (0.5 µg/mL, Sigma) in the presence of protein transport inhibitor GolgiStop (BD Biosciences). The cells were then fixed and permeabilized using a Cytotfix/Cytoperm Plus Fixation/Permeabilization Kit (BD Biosciences) and stained with phycoerythrin (PE)-conjugated antibody anti-IFN- γ (Beckman Coulter, emission at 578 nm). An appropriate isotype-matched antibody was used for controls. IFN- γ expression was analyzed by flow cytometry.

Statistical analysis

All results were presented as means \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by a PSLD Fischer post-hoc test or by the Z test for correlation using STATVIEW 5.0 software (Abacus Concepts, Berkley, CA). Different letters show significant differences between two groups at $p < 0.05$.

Results

Ob-R expression in NK-92 cells is independent of leptin concentration

Immunofluorescent confocal microscopy confirmed the extranuclear localization of leptin receptor Ob-Rt in the NK-92 cells (Fig. 1A), as previously reported (Zhao et al., 2003). mRNA Ob-R is constitutively expressed in NK-92 cells (Fig. 1B). Leptin at 10 ng/mL seemed to upregulate Ob-Rt mRNA expression (+ 39% 0 vs 10 ng/mL of leptin) while leptin at 100 and 200 ng/mL downregulated it. Ob-R protein expression was unchanged whatever the concentration of leptin tested and the receptor isoform studied. Leptin treatment did not alter the protein expression of either long or short Ob-R (Fig. 1C, D and E).

Leptin stimulates the metabolic activity of NK-92 cells

Leptin significantly increased the metabolic activity of NK-92 cells (Fig. 2A). This effect was dose-dependent and observed throughout the experimental period i.e. from 24h to 96h of culture. Irrespective of the culture duration, the respiratory rate of the cells treated with 100 ng/ml of leptin increased approximately 3.2 fold in comparison with the physiological dose of leptin (10 ng/mL). This increase reached 4.2 for the pharmacological dose of leptin (200 ng/ml vs 10 ng/mL $p < 0.05$) and was greatest from 24 h of culture. However, the intensity of the effect of leptin on NK-92 metabolic activity decreased significantly over time regardless of the concentration tested. Cell cycle distribution and cell death were unchanged whatever the leptin treatment used or the period studied (Fig. 2B). In parallel, no change was observed in NK cell proliferation and viability (94%), whatever the duration of culture (24, 48, 72 and 96 h) or the concentration tested (0, 10, 100 and 200 ng/mL) (data not shown).

Leptin modulates NK-92 cell lytic activity differently according to the target cells

NK-92 cells were cytotoxic against the three tumor cell lines studied (Fig. 3A). Interestingly, in the absence of leptin, NK cytotoxicity against MDA-MB-231-EGFP ($23.0 \pm 2\%$) and MCF-7-EGFP ($20.9 \pm 1\%$) cells was significantly higher than that observed against K562-EGFP ($13.2 \pm 1\%$) (Fig. 3B, C and D). Leptin at the concentration of 10 ng/mL had no additional effect, except a significant decrease upon contact with MCF-7 target cells. High leptin concentrations (100 and 200 ng/mL) significantly increased NK cell lytic activity against K562-EGFP and MDA-MB-231-EGFP targets (Fig. 3B and C). Inversely, NK cell cytotoxicity against MCF-7-EGFP was decreased ($p < 0.05$) in the presence of 10 and 200 ng/mL of leptin (Fig. 3D).

At 48h, a positive correlation was observed between NK cell metabolic activity and cytotoxicity against K562 and MDA-MB231 target cell lines ($r = 0.605$, $p = 0.003$; $r = 0.671$, $p < 0.001$ respectively) and a negative correlation was obtained with the MCF-7 cell line ($r = -0.437$, $p = 0.0149$).

Leptin downregulates the expression of perforine and upregulates that of TRAIL

As shown in Fig. 4, perforin and granzyme B mRNA, two lytic mediators involved in the lytic response, were constitutively expressed in NK-92 cells (Fig. 4A). Leptin at 10 and 100 ng/mL tended to increase (respectively $p=0.09$ and $p=0.07$) NK-92 perforin gene expression while at 200 ng/mL it significantly downregulated its expression. Higher leptin concentrations also enhanced granzyme B mRNA expression ($p<0.05$). Fas-L and TRAIL mRNA, major effectors of the killing response, were also constitutively expressed (Fig. 4B). Leptin treatment at 10 ng/mL increased both the mRNA expression of Fas-L ($p>0.05$) and TRAIL. Inversely, in the presence of 100 and 200 ng/mL of leptin, there was a decrease in both Fas-L and TRAIL gene expression compared to the physiological condition (Fig. 4B).

Leptin significantly reduced the expression of perforin protein in a dose dependent manner (Fig. 4C and D). Granzyme B expression was significantly decreased in response to the pharmacological concentration compared to the obesity concentration (Fig. 4C and E). Similarly, Fas-L expression was reduced in the presence of 200 mg/L of leptin compared to the other concentrations (Fig. 4C and G). Only high leptin concentrations (100 and 200 ng/mL) significantly increased the protein level of TRAIL (Fig. 4C and F).

Leptin increases NK cell IFN- γ production

Leptin at 100 ng/mL significantly increased the mRNA level of IFN- γ ($p<0.05$ vs absence, 10 and 200 ng/mL of leptin) (data not shown). After PMA/ionomycin stimulation, the proportion of IFN- γ expressing NK-92 cells increased ($p<0.05$) with 100 and 200 ng/mL of leptin compared to the control (10 ng/mL) (Fig. 5A). When IFN- γ production is reported as mean fluorescence intensity, leptin treatment, irrespective of the concentration used, had no effect (Fig. 5B), suggesting that leptin increased the number of NK-92 cells producing IFN- γ without affecting the quantity of IFN- γ produced by the cells.

Discussion

Because of its dual nature as a hormone and a cytokine, leptin can be considered as a link between the neuroendocrine and immune systems and cancer (Fantuzzi and Faggioni, 2000; Fernandez-Riejos et al., 2010; Grossmann et al., 2010). A high level of leptin has been positively correlated with a higher incidence of breast cancer (Jarde et al., 2011; Vona-Davis and Rose, 2007) and this adipokine can also modulate immune cells (Fernandez-Riejos et al., 2010). NK cells are a subgroup of lymphocytes that play an essential role in the cellular based immune defense of virus infected and transformed cells (Vivier et al., 2008). We decided therefore to study the effects of leptin on NK cell functions i.e. lytic activity and cytokine production.

In agreement with Zhao (2003), we observed that human NK-92 cells constitutively express Ob-R irrespective of the leptin concentration tested. As reported in our study, the effects of leptin were not mediated by the modulation of OB-R_S or Ob-R_L expression.

We show for the first time that leptin stimulates the mitochondrial activity of NK cells at the basal state without affecting viability, cell cycle and apoptosis. Target cell cytolysis induced by NK cells is dependent on mitochondrial activity (Abarca-Rojano et al., 2009). Our findings confirm that leptin enhances NK cytotoxicity against K562 target cells (Wrann et al., 2012; Zhao et al., 2003). Thus, leptin could increase NK cytotoxicity against K562 by stimulating mitochondrial activity.

Inversely, animal models, such as *ob/ob* or *db/db* mice, exhibit impaired NK functions compared with wild mice, confirming that leptin is a direct stimulator of NK cells (Chandra, 1980; Kanda et al., 2004; Tian et al., 2002). Leptin *via* Ob-R activates several intracellular signaling events, including the JAK/STAT, MAPK, PI3K and mTOR pathways. The mechanisms by which leptin controls the NK functions are little known. They include the JAK2/STAT3 and ERK pathways (Nave et al., 2008; Zhao et al., 2003). It has been reported that in NK YT cell line, leptin promotes the gene expression of effectors involved in NK cytotoxicity such as IL-2 and perforin (Zhao et al., 2003).

Our study was novel in using MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines to explore the effects of leptin on NK-92 cytotoxicity. As observed against K562 target, high leptin concentration increased NK-92 cytotoxicity against MDA-MB-231 cells. Conversely, in the presence of 100 and 200 ng/mL of leptin, NK-92 lytic activity against MCF-7 cells was decreased. These results suggest for the first time that the effects of leptin on NK cell cytotoxicity vary according to the cancer cell targets.

When activated, NK cells release granules containing perforin and granzymes, leading to the perforation of target cells and subsequently to apoptotic death (Cullen and Martin, 2008). Fas-L and TRAIL ligands, are directly involved in NK cytotoxicity by promoting apoptosis of target cells (Screpanti et al., 2005; Screpanti et al., 2001; Smyth et al., 2001; Vivier et al., 2008). Leptin at 100 and 200 ng/mL decreased perforin expression in a dose dependent manner whereas only the highest concentration downregulated mRNA perforin expression. In the same conditions, no change in gene and protein expressions of granzyme B was observed. Fas-L NK-92 mRNA was not significantly

regulated by leptin; however, the highest leptin concentration reduced Fas-L protein expression. Unlike its gene expression, TRAIL is over-expressed in the presence of high concentrations of leptin. Hence leptin appears to affect differently the expression of the lytic molecular effectors of NK-92 cells. Because MDA-MB-231 breast cancer cells are Fas-L resistant (Ruiz-Ruiz et al., 2000; Yu et al., 1999) and TRAIL sensitive (Jang et al., 2010; Rahman et al., 2009), the enhanced expression of TRAIL induced by leptin could be one of the possible mechanisms involved in the increased NK-92 cytotoxicity. MCF-7 cells are resistant to Fas-L and TRAIL mediated apoptosis (Danforth and Zhu, 2005; Jang et al., 2010; Rahman et al., 2009; Ruiz-Ruiz et al., 2000; Yu et al., 1999), suggesting that only perforin and granzymes are involved in target cell cytolysis. Thus, the reduction in perforin expression observed may explain the decreased NK-92 cytotoxicity against MCF-7. Although K562 cells were both Fas-L and TRAIL resistant (Bhattacharya et al., 2010; Kim et al., 2009), NK-92 cytotoxicity against these cells was increased with high concentrations of leptin. Thus, other mechanisms involved in NK functions, such as activator receptors NKp30, NKp46 and NKG2D (Lanier, 2005), could be modulated by leptin. K562 cells are known to be more sensitive to NK cytotoxicity mediated by NKp30 and NKp46 than MCF-7 cells (Mamessier et al., 2011).

Our data show that leptin, at the concentration found in obesity, enhanced NK cell cytotoxicity against breast cancer cells. However, at the same concentration leptin is associated with the development of breast cancer (Grossmann et al., 2010). It is possible therefore that leptin by downregulating the extrinsic (death receptor-mediated) pathway of apoptosis in transformed cells reduces their sensitivity to the NK cell death ligands.

IFN- γ production is an integral part of NK cell functions and it promotes NK cell cytolysis (Ikeda et al., 2002; Street et al., 2001; Wang et al., 2011). Leptin increased the proportion of NK cells expressing IFN- γ . Hence, IFN- γ plays a part in enhancing the effect of leptin on NK lytic activity. It has been recently reported that IFN- γ together with TNF- α improve NK cytotoxicity *via* stimulation of the expression of adhesion factor (ICAM-1) on target cells (Wang et al., 2011).

In conclusion, this study shows for the first time that leptin increases NK-92 metabolic activity in a dose-dependent manner and modulates differently NK-92 cytotoxicity according to the target cells tested. The down-expression of NK cell perforin and the over-expression of TRAIL and IFN- γ in the presence of a high leptin concentration may explain the reduced cytolysis of MCF-7-EGFP and the enhanced cytolysis against MDA-MB-231-EGFP cells. These findings should be confirmed in NK cells isolated from peripheral blood of healthy donors and could contribute to a better understanding of the effects of leptin on antitumor defense.

Acknowledgements

The authors thank Professor E. Vivier (Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Université de la Méditerranée, France) for providing the NK-92 cell line, Dr F. Rossignol (ADELBIO, Clermont-Ferrand, France) for the gift of MCF-7-EGFP and MDA-MB-231-EGFP cell lines, Dr W. Kantakamalakul (Department of Microbiology, Faculty of Medicine Siriraj Hospital, Mahidol University, Bangkok Thailand) for graciously giving the K562-EGFP cell line and S. Rougé (Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire et Nutrition, UFR de Pharmacie, Université d'Auvergne, Clermont-1) for her technical assistance.

References

- Abarca-Rojano E, Muniz-Hernandez S, Moreno-Altamirano MM, Mondragon-Flores R, Enriquez-Rincon F, Sanchez-Garcia FJ. 2009. Re-organization of mitochondria at the NK cell immune synapse. *Immunol Lett* 122(1):18-25.
- Allegra S, Deleigne C, Michael-Jubely R, Gryson C, Boirie Y, Kantakamalakul W, Vasson MP. 2006. Implementation of the EGFP-K562 flow cytometric NK test: determination of NK cytotoxic activity in healthy elderly volunteers before and after feeding. *Cytometry A* 69(9):992-998.
- Bhattacharya K, Samanta SK, Tripathi R, Mallick A, Chandra S, Pal BC, Shaha C, Mandal C. 2010. Apoptotic effects of mahanine on human leukemic cells are mediated through crosstalk between Apo-1/Fas signaling and the Bid protein and via mitochondrial pathways. *Biochem Pharmacol* 79(3):361-372.
- Calle EE, Kaaks R. 2004. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer* 4(8):579-591.
- Chandra RK. 1980. Cell-mediated immunity in genetically obese C57BL/6J ob/ob mice. *Am J Clin Nutr* 33(1):13-16.
- Conde J, Scotece M, Gomez R, Gomez-Reino JJ, Lago F, Gualillo O. 2010. At the crossroad between immunity and metabolism: focus on leptin. *Expert Rev Clin Immunol* 6(5):801-808.
- Cullen SP, Martin SJ. 2008. Mechanisms of granule-dependent killing. *Cell Death Differ* 15(2):251-262.
- Czekanska EM. 2011. Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye. *Methods Mol Biol* 740:27-32.
- Danforth DN, Zhu Y. 2005. Conversion of Fas-resistant to Fas-sensitive MCF-7 breast cancer cells by the synergistic interaction of interferon-gamma and all-trans retinoic acid. *Breast Cancer Res Treat* 94(1):81-91.
- El Guerrab A, Zegrou R, Nemlin CC, Vigier F, Cayre A, Penault-Llorca F, Rossignol F, Bignon YJ. 2011. Differential impact of EGFR-targeted therapies on hypoxia responses: implications for treatment sensitivity in triple-negative metastatic breast cancer. *PLoS One* 6(9):e25080.
- Fantuzzi G, Faggioni R. 2000. Leptin in the regulation of immunity, inflammation, and hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 68(4):437-446.
- Fernandez-Riejos P, Najib S, Santos-Alvarez J, Martin-Romero C, Perez-Perez A, Gonzalez-Yanes C, Sanchez-Margalet V. 2010. Role of leptin in the activation of immune cells. *Mediators Inflamm* 2010:568343.
- Grossmann ME, Ray A, Nkhata KJ, Malakhov DA, Rogozina OP, Dogan S, Cleary MP. 2010. Obesity and breast cancer: status of leptin and adiponectin in pathological processes. *Cancer Metastasis Rev* 29(4):641-653.
- Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. 2002. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting. *Cytokine Growth Factor Rev* 13(2):95-109.
- Jang JY, Jeon YK, Choi Y, Kim CW. 2010. Short-hairpin RNA-induced suppression of adenine nucleotide translocase-2 in breast cancer cells restores their susceptibility to TRAIL-induced apoptosis by activating JNK and modulating TRAIL receptor expression. *Mol Cancer* 9:262.
- Jarde T, Caldefie-Chez F, Goncalves-Mendes N, Mishellany F, Buechler C, Penault-Llorca F, Vasson MP. 2009. Involvement of adiponectin and leptin in breast cancer: clinical and in vitro studies. *Endocr Relat Cancer* 16(4):1197-1210.
- Jarde T, Perrier S, Vasson MP, Caldefie-Chez F. 2011. Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer. *Eur J Cancer* 47(1):33-43.
- Kanda T, Takahashi T, Kudo S, Takeda T, Tsugawa H, Takekoshi N. 2004. Leptin deficiency enhances myocardial necrosis and lethality in a murine model of viral myocarditis. *Life Sci* 75(12):1435-1447.
- Kantakamalakul W, Jaroenpool J, Pattanapanyasat K. 2003. A novel enhanced green fluorescent protein (EGFP)-K562 flow cytometric method for measuring natural killer (NK) cell cytotoxic activity. *J Immunol Methods* 272(1-2):189-197.
- Kim MJ, Kim HB, Bae JH, Lee JW, Park SJ, Kim DW, Park SI, Kang CD, Kim SH. 2009. Sensitization of human K562 leukemic cells to TRAIL-induced apoptosis by inhibiting the DNA-PKcs/Akt-mediated cell survival pathway. *Biochem Pharmacol* 78(6):573-582.
- Lanier LL. 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23:225-274.
- Loffreda S, Yang SQ, Lin HZ, Karp CL, Brengman ML, Wang DJ, Klein AS, Bulkley GB, Bao C, Noble PW, Lane MD, Diehl AM. 1998. Leptin regulates proinflammatory immune responses. *FASEB J* 12(1):57-65.
- Lord GM, Matarese G, Howard JK, Baker RJ, Bloom SR, Lechler RI. 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 394(6696):897-901.

- Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, et al. 1995. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1(11):1155-1161.
- Magnani E, Bettini E. 2000. Resazurin detection of energy metabolism changes in serum-starved PC12 cells and of neuroprotective agent effect. *Brain Res Brain Res Protoc* 5(3):266-272.
- Mamessier E, Sylvain A, Bertucci F, Castellano R, Finetti P, Houvenaeghel G, Charaffe-Jaufret E, Birnbaum D, Moretta A, Olive D. 2011. Human breast tumor cells induce self-tolerance mechanisms to avoid NKG2D-mediated and DNAM-mediated NK cell recognition. *Cancer Res* 71(21):6621-6632.
- Matarese G, Moschos S, Mantzoros CS. 2005. Leptin in immunology. *J Immunol* 174(6):3137-3142.
- Merlin E, Goncalves-Mendes N, Hannani D, de la Torre A, Farges MC, Laroye H, Demeocq F, Kanold J, Vasson MP. 2011. Extracorporeal photochemotherapy induces arginase 1 in patients with graft versus host disease. *Transpl Immunol* 24(2):100-106.
- Nave H, Mueller G, Siegmund B, Jacobs R, Stroh T, Schueler U, Hopfe M, Behrendt P, Buchenauer T, Pabst R, Brabant G. 2008. Resistance of Janus kinase-2 dependent leptin signaling in natural killer (NK) cells: a novel mechanism of NK cell dysfunction in diet-induced obesity. *Endocrinology* 149(7):3370-3378.
- Nkhata KJ, Ray A, Schuster TF, Grossmann ME, Cleary MP. 2009. Effects of adiponectin and leptin co-treatment on human breast cancer cell growth. *Oncol Rep* 21(6):1611-1619.
- O'Brien J, Wilson I, Orton T, Pognan F. 2000. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur J Biochem* 267(17):5421-5426.
- Rahman M, Pumphrey JG, Lipkowitz S. 2009. The TRAIL to targeted therapy of breast cancer. *Adv Cancer Res* 103:43-73.
- Ray A, Nkhata KJ, Cleary MP. 2007. Effects of leptin on human breast cancer cell lines in relationship to estrogen receptor and HER2 status. *Int J Oncol* 30(6):1499-1509.
- Renehan AG. 2010. Obesity and cancer in Asia-Pacific populations. *Lancet Oncol* 11(8):704-705.
- Ruiz-Ruiz C, Munoz-Pinedo C, Lopez-Rivas A. 2000. Interferon-gamma treatment elevates caspase-8 expression and sensitizes human breast tumor cells to a death receptor-induced mitochondria-operated apoptotic program. *Cancer Res* 60(20):5673-5680.
- Saxena NK, Vertino PM, Anania FA, Sharma D. 2007. leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to CYCLIN D1 promoter via activation of Stat3. *J Biol Chem* 282(18):13316-13325.
- Schoenborn JR, Wilson CB. 2007. Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses. *Adv Immunol* 96:41-101.
- Screpanti V, Wallin RP, Grandien A, Ljunggren HG. 2005. Impact of FASL-induced apoptosis in the elimination of tumor cells by NK cells. *Mol Immunol* 42(4):495-499.
- Screpanti V, Wallin RP, Ljunggren HG, Grandien A. 2001. A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells. *J Immunol* 167(4):2068-2073.
- Smyth MJ, Cretney E, Takeda K, Wiltrot RH, Sedger LM, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K. 2001. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis. *J Exp Med* 193(6):661-670.
- Street SE, Cretney E, Smyth MJ. 2001. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood* 97(1):192-197.
- Tian Z, Sun R, Wei H, Gao B. 2002. Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation. *Biochem Biophys Res Commun* 298(3):297-302.
- Tilg H, Moschen AR. 2006. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 6(10):772-783.
- Tonn T, Becker S, Esser R, Schwabe D, Seifried E. 2001. Cellular immunotherapy of malignancies using the clonal natural killer cell line NK-92. *J Hematother Stem Cell Res* 10(4):535-544.
- Vivier E, Raulet DH, Moretta A, Caligiuri MA, Zitvogel L, Lanier LL, Yokoyama WM, Ugolini S. 2011. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science* 331(6013):44-49.
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. 2008. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol* 9(5):503-510.
- Vona-Davis L, Rose DP. 2007. Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocr Relat Cancer* 14(2):189-206.
- Wang R, Jaw JJ, Stutzman NC, Zou Z, Sun PD. 2011. Natural killer cell-produced IFN-gamma and TNF-alpha induce target cell cytotoxicity through up-regulation of ICAM-1. *J Leukoc Biol* 91(2):299-309.
- Wrann CD, Laue T, Hubner L, Kuhlmann S, Jacobs R, Goudeva L, Nave H. 2012. Short-term and long-term leptin exposure differentially affect human natural killer cell immune functions. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302(1):E108-116.

- Yu W, Israel K, Liao QY, Aldaz CM, Sanders BG, Kline K. 1999. Vitamin E succinate (VES) induces Fas sensitivity in human breast cancer cells: role for Mr 43,000 Fas in VES-triggered apoptosis. *Cancer Res* 59(4):953-961.
- Zhao Y, Sun R, You L, Gao C, Tian Z. 2003. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 300(2):247-252.

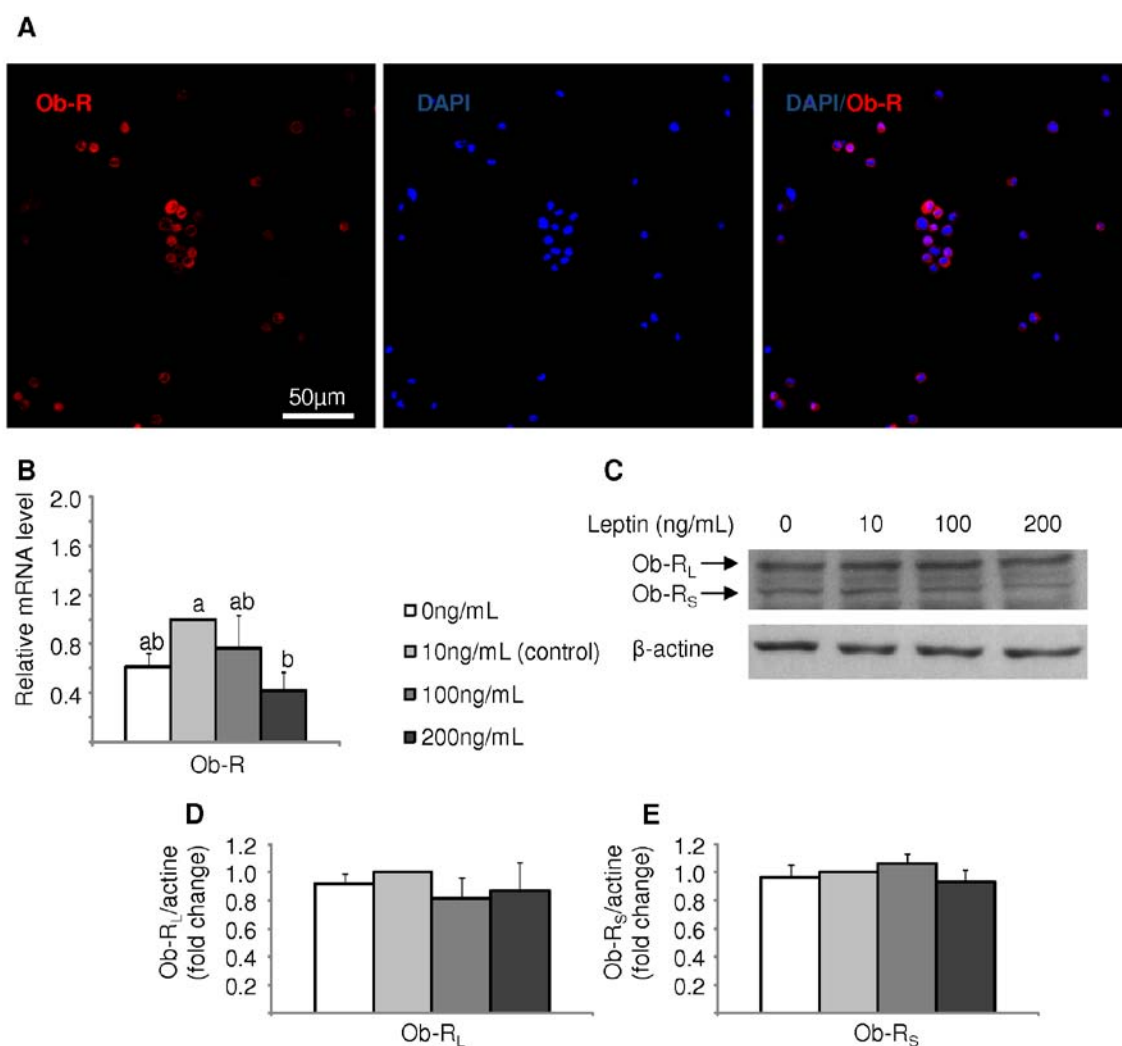


Figure 1. Expression of leptin receptor in NK-92 cells

Immunofluorescent staining for Ob-R (red) and nuclei with DAPI (blue) in NK-92 cells. (A) Picture shows the cell surface expression of Ob-R on the left, nucleus staining in the middle, and merged images on the right. Images were taken at x 40 magnification.

Effects of Leptin on NK-92 cell Ob-R gene and protein expression. NK-92 cells were cultured for 48h in media containing different concentrations of leptin (absence, 10, 100 and 200 ng/mL). (B) NK-92 cell mRNA expression of Ob-Rt was quantified by RT-qPCR. (C) NK cell Ob-R_L and Ob-R_S expressions of Ob-Rt were quantified by Western blot.

Data are reported as mean ± SEM of three experiments performed in triplicate; one-way ANOVA plus PSLF Fisher post-hoc test, a ≠ b, p<0.05.

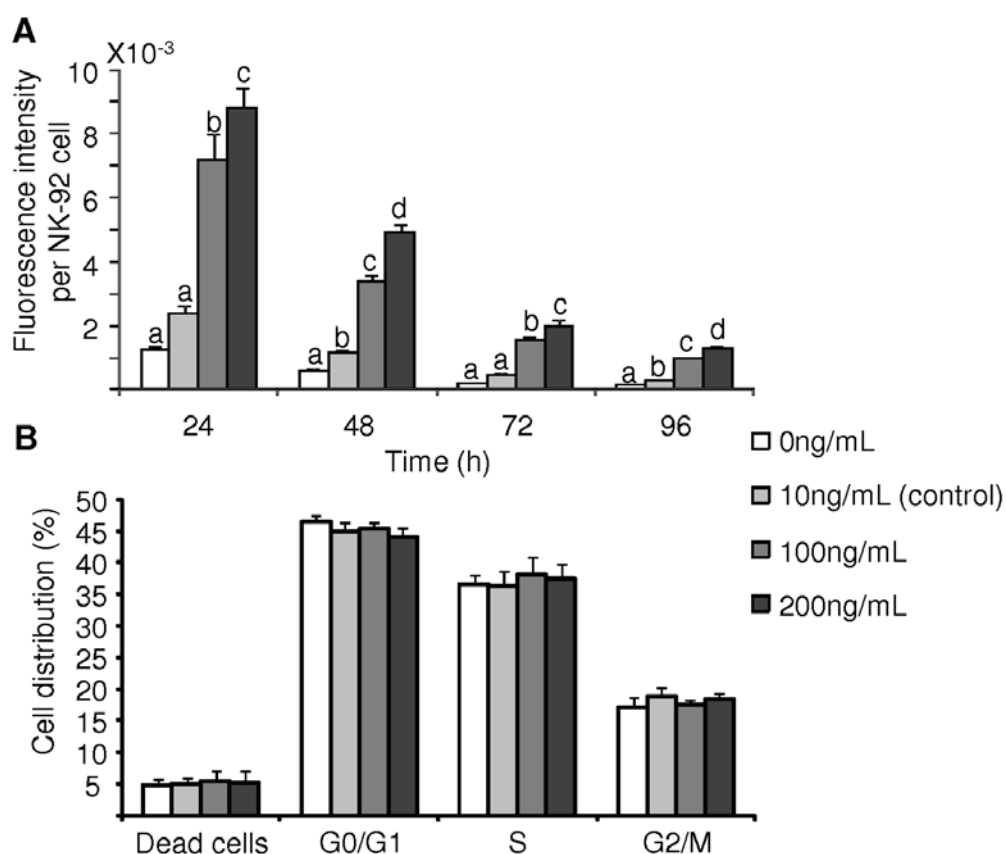


Figure 2. Effects of Leptin on NK-92 cell metabolic activity and cell cycle

NK cells were cultured over a period of 96 h in media with various concentrations of leptin (absence, 10, 100 and 200 ng/mL). (A) Metabolic activity was assessed using the resazurin test. (B) After 48 h of culture with or without leptin, the percentage of cell cycle distribution of NK cells was assessed by flow cytometry using propidium iodide staining. The experiments were performed in triplicate and the data were shown as mean \pm SEM from three experiments; one-way ANOVA plus PSLF Fisher post-hoc test, $a \neq b \neq c \neq d$, $p < 0.05$.

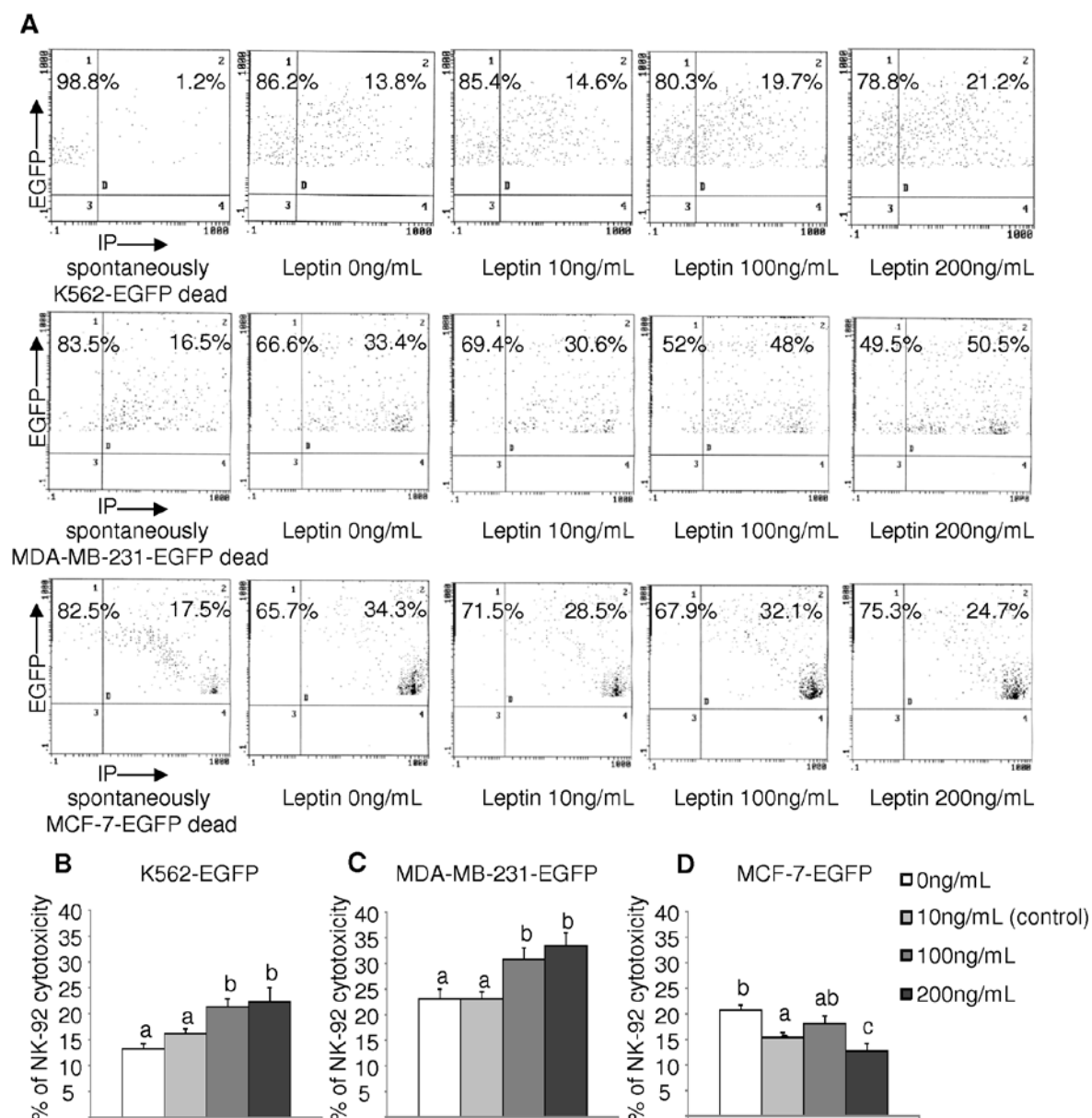


Figure 3. Effects of Leptin on NK-92 cell cytotoxicity against K562-EGFP, MDA-MB-231-EGFP and MCF-7-EGFP

NK-92 cells were first cultured for 48h in media containing different concentrations of leptin (absence, 10, 100 and 200 ng/mL) and then incubated with target cells at 5:1 effector-to-target ratio. Cytotoxic activity i.e. the percentages target cell dead (EGFP+PI+), was evaluated by flow cytometry. (A) Flow cytometry plots of one representative experiment according to the target cell used: K562-EGFP cells, MDA-MB-231-EGFP cells and MCF-7-EGFP cells. (B) Percentage of NK-92 cell cytotoxicity against K562-EGFP. (C) Percentage of NK-92 cytotoxicity against MDA-MB-231-EGFP. (D) Percentage of NK-92 cytotoxicity against MCF-7-EGFP. The experiments were performed in triplicate and the data are shown as means \pm SEM from three independent experiments. One-way ANOVA plus PSLF Fisher post-hoc test, $a \neq b \neq c$, $p < 0.05$.

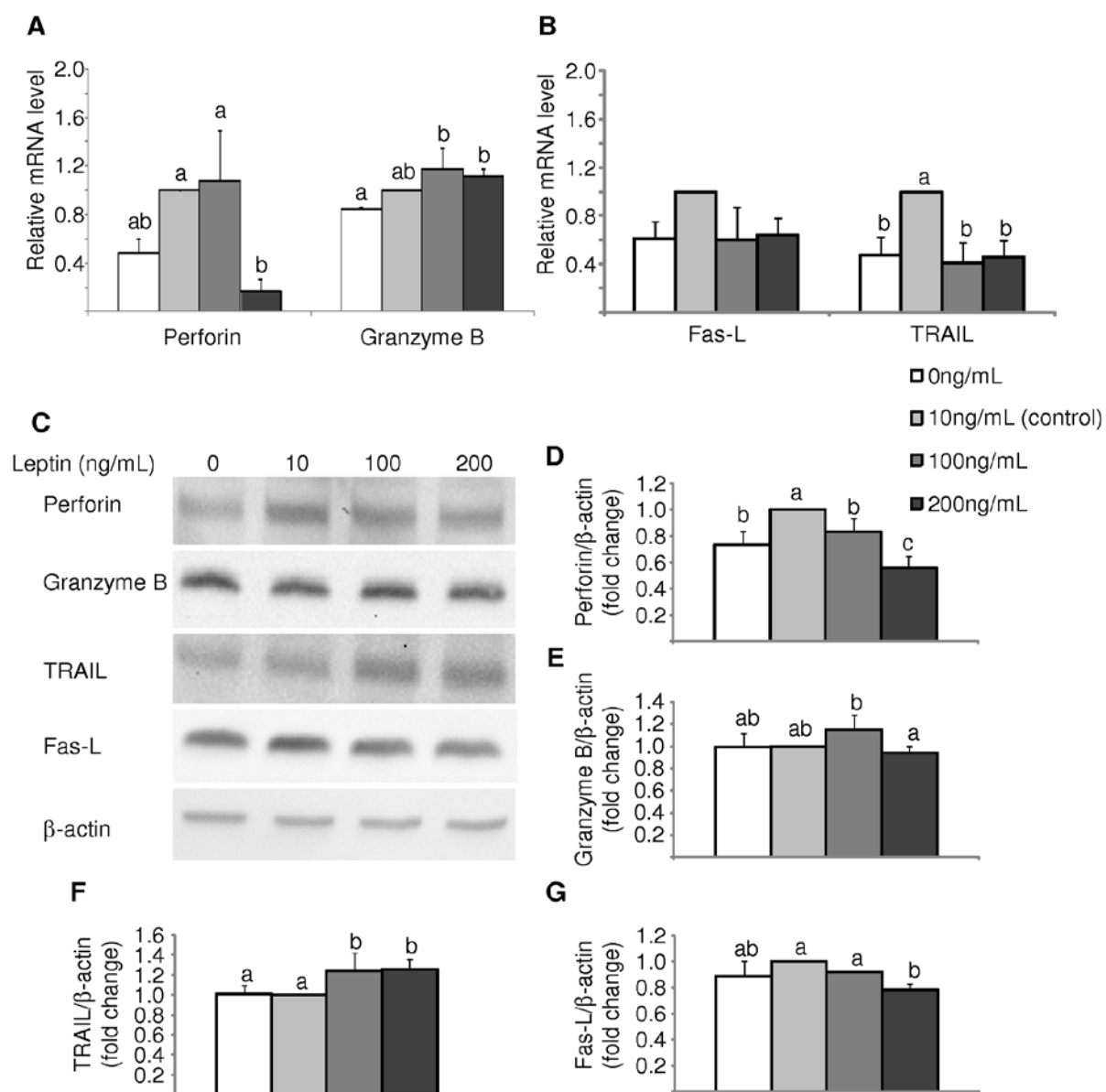


Figure 4. Effects of Leptin on cytotoxic effector molecule gene and protein expression

After 48 h of culture in media containing different concentrations of leptin (absence, 10, 100 and 200 ng/mL), NK-92 cell mRNA and protein expression of lytic granules and death ligands (Fas-L and TRAIL) was detected by RT-qPCR (A and B) and Western blotting (C to G). Values are mean \pm SEM of three independent experiments with in triplicate; one-way ANOVA plus PSLF Fisher post-hoc test, $a \neq b$, $p < 0.05$.

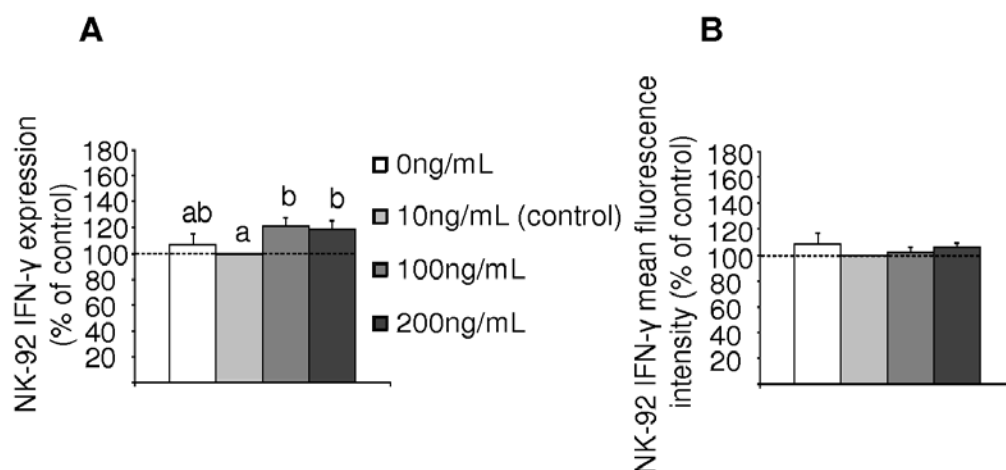


Figure 5. Leptin effects on IFN- γ expression in NK-92 cells

After 48 h of culture in media containing various concentrations of leptin (absence, 10, 100 and 200 ng/mL), NK-92 cells were harvested and stimulated 4h with PMA and ionomycin and in the presence of protein transport inhibitor GolgiStop (BD Biosciences). Intracellular IFN- γ expression was determined by flow cytometry using an antibody anti-IFN- γ labeled with PE. IFN- γ production was reported as (A) percentage of variation *versus* the physiological leptin concentration and (B) mean fluorescence intensity. Results are expressed as mean \pm SEM of three independent experiments, performed in triplicate. Statistical analysis was carried out by one-way ANOVA plus PSLF Fisher post-hoc test, $a \neq b$, $p < 0.05$.

Table 1: Summary of PCR primers used in this work

Gene name	Genbank accession	Primer sequences	Annealing temperature
18S	NR_003286	FP: GTCTGTGATGCCCTTAGA RP: AGCTTATGACCCGCACTTAC	57°C
Leptin	NM_000230	FP: TGAGCACCTGCTTCATGCTC RP: TGAGTGCGGTTTGACCACTG	62°C
Ob-Rt	NM_001003680	FP: CATTTTATCCCCATTGAGAAGTA RP: CTGAAAATTAAGTCCTTGTGCCCAG	67°C
Perforin	NM_001083116	FP: GCAATGTGCATGTGTCTGTG RP: TCCGAGTGGCGCTCCCGGTA	64°C
Granzyme B	NM_004131	FP: GGGGAAGCTCCATAAATGTCACCT RP: TACACACAAGAGGGCCTCCAGAGT	53°C
Fas-L	NM_000639	FP: TCAATGAAACTGGGCTGTACTTT RP: AGAGTTCCTCATGTAGACCTTGT	48°C
TRAIL	NR_033994	FP: CAACTCCGTCAGCTCGTTAGAAAG RP: TTAGACCAACAACCTATTTCTAGCACT	50°C
IFN- γ	NM_000619	FP: TTCAGCTCTGCATCGTTTTG RP: TCAGCCATCACTTGGATGAG	59°C

FP: Forward primer; RP: Reverse primer

Etude n°3

Impact *in vitro* d'une déplétion en arginine sur la fonctionnalité des cellules NK

Bruno Lamas, Juliette Vergnaud-Gauduchon, Nicolas Goncalves-Mendes, Olivier Perche, Adrien Rossary, Marie-Paule Vasson and Marie-Chantal Farges

Cellular Immunology - Soumise

Présentation de l'étude n°3

Introduction

Les cellules Natural Killer (NK), de part leur activité cytotoxique et sécrétoire, participent à la vigilance anti-tumorale. L'arginine (Arg), *via* le monoxyde d'azote ou l'ornithine, active les fonctions des cellules immunitaires telles que les cellules NK et les lymphocytes T. Dans le micro-environnement tumoral, une déplétion locale en Arg est observée suite à la libération d'arginase I par les phagocytes apoptotiques et la consommation élevée d'Arg par les cellules suppressors dérivées des myéloïdes et par la tumeur. Cette déplétion provoque l'inhibition de la prolifération et de l'expression de la chaîne zéta (ζ) du CD3 des lymphocytes T. Ce peptide ζ , présent dans les récepteurs NKp30 et NKp46 des cellules NK, contribue à leur activation.

But de l'étude

Le but de cette étude est d'explorer, *in vitro*, l'effet d'une déplétion en Arg, sur les voies métaboliques de cet acide aminé dans un modèle de cellules NK humaines dépendantes de l'IL-2 (NK-92) et sur la fonctionnalité des cellules NK-92 et des cellules NK circulantes humaines.

Matériels et Méthodes

Les cellules NK circulantes issues de volontaires sains ont été séparées par gradient de densité et sélectionnées par tri magnétique. Ces cellules et la lignée NK-92 ont été cultivées pendant 48h en présence de concentrations variables d'Arg (0 ; 2,5 ; 5 ; 15 (physiologie) ; et 200 (standard RPMI) mg/L). La prolifération et la viabilité des cellules NK-92 ont été déterminées respectivement par le test à la résazurine et par exclusion au bleu Trypan. La cytotoxicité et l'expression de la chaîne zéta ont été quantifiées pour les deux types cellulaires par cytométrie en flux (CMF). La distribution dans le cycle cellulaire des cellules NK-92 et le pourcentage de ces cellules exprimant le CD25 (IL-2R α), l'IFN- γ et les récepteurs NKp30 et NKp46 ont été explorés par CMF. De plus, l'expression génique des transporteurs et des enzymes impliqués dans le métabolisme de l'Arg, à savoir les « cationic amino-acid transporters » 1 et 2B (*Cat 1* et *Cat 2b*), l'arginase I et II, l'ornithine décarboxylase (*ODC*), l'ornithine aminotransférase, l'oxyde nitrique synthase endothéliale (*eNOS*) et inductible, a été évaluée par RT-qPCR.

Résultats majeurs

Une concentration inférieure à 5 mg/L d'Arg provoque une diminution de la prolifération des cellules NK-92 et la déplétion totale en Arg réduit la viabilité de ces cellules sans moduler la distribution dans le cycle cellulaire et l'expression du CD25. De faibles concentrations d'Arg inhibent

également la cytotoxicité et l'expression de la chaîne ζ des cellules NK-92 et des cellules NK circulantes. De plus, les pourcentages de cellules NK-92 exprimant l'IFN- γ et les récepteurs activateurs NKp30 et NKp46 sont diminués lors d'une déplétion en Arg. L'expression génique des transporteurs et des enzymes intervenant dans le métabolisme de l'Arg n'est pas significativement modulée par la déplétion en Arg quelle que soit la concentration testée. Toutefois, en présence de 2,5 mg/L d'Arg l'expression des ARNm de *Cat 1*, *Cat 2b*, l'*eNOS*, l'*arginase 1* et de l'*ODC* tend à être augmentée.

Conclusion

La déplétion en Arg inhibe la cytotoxicité des cellules NK-92 et des cellules NK circulantes. Une moindre reconnaissance des cellules cibles par les récepteurs activateurs NKp30 et NKp46, un défaut de transmission du signal activateur par la chaîne ζ et une faible production d'IFN- γ lors d'une déplétion en Arg peuvent expliquer l'inhibition de la cytotoxicité des cellules NK. L'Arg, aux concentrations testées, ne module pas l'expression génique de ses transporteurs membranaires et des enzymes impliquées dans son métabolisme. Cependant, des modulations post-transcriptionnelles et/ou des variations de l'activité des enzymes pourraient être impliquées dans la moindre réactivité anti-tumorale des cellules NK.

Toutes ces données, *in vitro*, contribuent à étayer l'hypothèse d'une réduction de la cytotoxicité des cellules NK en situation de cancer, où il existe une déplétion locale et/ou systémique en Arg.

Publication n°3

Altered functions of Natural Killer cells in response to L-arginine availability

Bruno Lamas ^{1,*}, Juliette Vergnaud-Gauduchon ¹, Nicolas Goncalves-Mendes ¹, Olivier Perche ¹,
Adrien Rossary ¹, Marie-Paule Vasson ^{1,2} and Marie-Chantal Farges ¹

¹Clermont Université, Université d'Auvergne, EA 4233, Nutrition Cancerogénèse et Thérapie anti-tumorale, CLARA, CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, France

²Centre Jean Perrin, Unité de Nutrition, Clermont-Ferrand, France

***Correspondence to :** Mr Bruno Lamas, UFR Pharmacie, EA 4233, Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire et Nutrition, 28 place Henri Dunant BP 38, 63001 Clermont-Ferrand cedex 1, France. Phone: +33 4 73 17 80 49; Fax: +33 4 73 17 80 38. E-mail: bruno.lamas@u-clermont1.fr

Running title: L-Arginine depletion and NK cell activity

Keywords: Activating receptors, Cytotoxicity, IFN- γ production, L-Arginine depletion, NK cells.

Number of figures: 8

Number of tables: 1

Abstract

L-Arginine (L-Arg) availability is crucial in the regulation of immune response. Indeed, L-Arg deficiency induces T-cell dysfunction and could modulate the properties of Natural Killer (NK) cells involved in the early host defense against infections and tumors. We explored the impact of L-Arg depletion on NK cell functions using two models - an NK-92 cell line and isolated human blood NK cells. Below 5 mg/mL of L-Arg NK-92 cell proliferation was decreased and a total L-Arg depletion reduced NK-92 cell viability. NK cell cytotoxicity was significantly inhibited in the presence of low L-Arg concentrations. L-Arg depletion reduced the expression of NK-92 activating receptors, NKp46 and NKp30, the expression of NK ζ chain and NK-92 intracellular production of IFN- γ . Whatever the L-Arg concentrations tested, no significant variation in the gene expression of transporters and enzymes involved in L-Arg metabolism was found. Thus, L-Arg availability modulated the phenotypic and functional properties of NK cells.

Keywords: activating receptors, cytotoxicity, IFN- γ production, L-Arginine depletion, NK cells.

Introduction

L-Arginine (L-Arg) is a semi-essential amino acid that plays a central role in many biological systems including immune response [1, 2]. L-Arg metabolism, which has mostly been studied in macrophages and T cells, is determined by the expression of cationic amino acid transporters (CAT), mainly the CAT 2B isoform [3, 4], enzymes such as inducible nitric oxide (iNOS), and two arginase isoforms (arginase I and II). Arginases are induced by Th2 cytokines while iNOS is induced by Th1 cytokines, transforming growth factor- β , and prostaglandin E2 [5, 6]. Arginases located in cytoplasm (isoform I) or in mitochondria (isoform II), respectively hydrolyze L-Arg into L-ornithine and urea. The resultant L-ornithine can then be used by ornithine decarboxylase (ODC) to form polyamines, essential factors required for mammalian cell proliferation, differentiation and neoplastic transformation. L-Arg can also be converted into citrulline and nitric oxide (NO), which is involved in vascular homeostasis and in the cytotoxic responses of granulocytes.

Altered L-Arg metabolism has been reported in several pathological states as cancer, chronic inflammatory and autoimmune diseases, trauma, infections, defense against pathogens and is often associated with immune suppression [2]. Altered L-Arg metabolism has been involved in cancer-induced immunosuppression [7-10]. L-Arg deficiency caused by high arginase activity, both at the tumor site [11] and in circulating blood [12], has been associated not only with sustained tumor growth *via* polyamine synthesis but also tumor escape from immune response [8-10]. Myeloid-derived suppressor cells (MDSC) in the tumor microenvironment present high arginase activities [8, 9]. Described as macrophages or immature dendritic cells, they deplete arginine from the microenvironment and profoundly downregulate the tumor-infiltrating T cells [8, 9]. Indeed, their proliferation is suppressed, the cell cycling is blocked in the G0-G1 phase [13, 14], the cytokine production [13] and the CD3 ζ chain expression are inhibited [11, 15, 16]. This latter effect was amino acid specific since the depletion of other amino acid such as L-glutamine, L-leucine and L-lysine did not alter the CD3 ζ chain expression [16]. This peptide is the principal signal transduction element of the T cell receptor [17]. MDSC cells can also exert their immunosuppressive effects through NO production, which affects the signaling pathway downstream to IL-2 receptor [1, 8, 9]. When arginase I and NOS are co-expressed, reduced L-Arg availability results in the switching of NOS activity from the production of NO to the generation of superoxide and highly reactive nitrogen species, which can also inhibit T cell function [1, 8, 9].

Downregulation of T cell function is proposed as one of the mechanisms of anti-tumor immune suppression, but other cells may be involved. Indeed, the tumor stroma contains not only MDSC and T cells but also NK cells, which destroy transformed or virus-infected cells

without prior sensitization. NK cells exert their function *via* two pathways: an antigen-independent and an antibody-dependent cellular lytic pathway *via* Fc receptor (CD16) expression. Both, involved different effectors (perforin/granzyme, death receptors) [18]. NK cell function is controlled by a balance between inhibitory and activating receptors. The first ones (e.g. KIR family, CD94-NKG2A) bind to self-major histocompatibility complex (MHC) class-I molecules whereas the second (e.g. NKG2D) bind to ligands expressed on stressed cells [19]. While the cellular ligands for activating receptors NKp30, NKp44 and NKp46 are unknown [19], some studies indicate that heparin sulfate [20] and hemagglutinin [21, 22] might be involved respectively in the recognition of tumor cells and virally infected cells by this receptors. More recently, NKp30 was shown to recognize as a ligand a B7 family homolog (B7-H6) expressed on a number of tumor cell lines, such as K562 [23]. CD3 ζ chain is associated with CD16, NKp30 and NKp46 and is essential for their functions [24]. NK cells are also the main source of IFN- γ which exerts stimulatory effects on the innate and adaptive immune systems and is involved in effective anti-tumor response [18]. IL-2 is a strong activator of NK cell activity and IFN- γ production [18, 25]. NK cells constitutively express IL-2R β and respond to IL-2 by upregulating IL-2R α chain (CD25) expression [26]. Several immune dysfunctions have been associated with changes in the metabolism of L-Arg. L-Arg depletion impairs T cell [11, 13-16] and macrophage [27] response. Few papers concern the NK cell functions in the context of L-Arg deficiency. However, it has been already reported that several NK functions e.g. proliferation, cytokine secretion are severely suppressed in the total absence of L-Arg [28, 29], while conflicting data have been reported for the cytotoxicity [28, 29]. This study aimed to evaluate the impact of L-Arg limitation on the proliferation, survival and functions (cytotoxicity and IFN- γ production) of the NK-92 cell line. Gene expression of transporters and enzymes involved in L-Arg metabolism were studied. Moreover, effects of L-Arg depletion were tested *ex vivo* on NK cells isolated from healthy volunteers.

Materials and Methods

NK-92 cell line culture conditions

Human lymphoma NK-92 cell line was maintained in complete RPMI 1640 Medium (Biowest) supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) (Biowest), 100 µg/mL streptomycin (Sigma), 100 U/mL penicillin (Sigma), 2 mM glutamine (Sigma), 1 mM sodium pyruvate (Sigma), 200 U/mL human rIL-2 (eBioscience) [30], and cultured at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere.

To test the effects of low L-Arg concentrations, we developed a hand-made medium based on RPMI 1640 but without L-Arg and nitrate. L-Arg (Sigma) was then added to this medium at final concentrations of 2.5 mg/L (e.g. 12 µmol/L), 5 mg/L (e.g. 24 µmol/L) or 15 mg/L (e.g. 72 µmol/L, circulating physiological concentration) to mimic extracellular variation in L-Arg, or 200 mg/L (e.g. 960 µmol/L) to match the Arg content in standard RPMI 1640 culture medium. Moreover, the FCS (10%) used was dialysed to eliminate L-Arg content. NK-92 cells were cultured in these media for 24 or 48 h at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere. For all the following determination, the same number of viable NK cells was used whatever the culture conditions.

NK-92 proliferation and viability measurements

NK-92 cells were cultured in media containing different concentrations of L-Arg (none, 2.5, 5, 15 (control) and 200 mg/L) at a density of 1.10^5 cells/mL. After 48 h of culture, 200 µL of each condition were removed and put in 96-well plate in triplicate. Resazurin (Sigma), dissolved in PBS was added to the cellular suspension at a final concentration of 25 µg/mL. Following 2 h of incubation under standard conditions, fluorescence excitation was exerted at 530 nm while emission was recorded at 590 nm (Fluoroskan Ascent SL, Dermo Electron Corporation). Under these conditions, fluorescence was proportional to the number of living cells in the well [31].

Cell viability was monitored using the trypan blue exclusion test. Cells were counted using a Malassez cell and viability was expressed as percentage of viable cells among total cells (living plus dead cells).

Cell-cycle measurement by DNA content

NK-92 cells previously treated with or without L-Arg from 48 h, were washed with PBS and fixed with 80% ice-cold ethanol at 4°C overnight. After two washings with PBS, cells were stained with a solution containing 6.5 µg/ml of propidium iodure (PI; Sigma) and 100 µg/ml RNase A (Invitrogen) for 30 min in the dark. The stained cells were analyzed by flow cytometry

on a Coulter Epics XL flow cytometry system (Beckman Coulter). The amount of intracellular DNA is proportional to the fluorescence intensity of the PI and is different during phases of cell cycle: G0/G1 (2n), S ($2 < n < 4$) and G2/M (4n). Moreover, fragmented apoptotic nuclei were identified by their subdiploid (sub-G1, ($< 2n$)) DNA content. The percentage of cells in sub-G1, G0/G1, S and G2/M phase was recorded for each condition.

NK-92 cytotoxicity assay

NK-92 cytotoxicity was assayed as previously described [32]. Briefly, human erythroleukemia K562 cell line stably transfected by enhanced green fluorescent protein (EGFP) (K562-EGFP) was used as target cells. After 48 h of culture in presence of various L-Arg concentrations, the same number of living NK-92 cells were mixed with target cells at different effector-to-target ratio. Maximum NK-92 cell cytotoxicity was obtained with 5:1 effector-to-ratio ($5 \cdot 10^4$ NK-92 cells and $1 \cdot 10^4$ K562-EGFP cells) and this ratio was chosen to determine the cytotoxic activity of NK cells. For cytotoxic assay, both effector and target cells were co-incubated in the different L-Arg-depleted media. After a 4 h of incubation at 37°C with 5% of CO₂, PI (250 µg/mL) was added to stain dead cells. Cytotoxic activity was analyzed by flow cytometry. Percent NK-92 cytotoxic activity was calculated as follows: cytotoxicity (%) = [(dead target cells (%) - spontaneously dead target cells (%)) / (100 - spontaneously dead target cells (%))] x100.

Flow cytometric analysis of CD25, CD3ζ, NKp46, NKp30 and IFN-γ

Conjugated antibodies (Abs) were anti-CD25-PE, anti-CD3ζ-PE, anti-CD335 (NKp46)-PE, anti-CD337 (NKp30)-PC5 and anti-IFN-γ-PE (Beckman Coulter). Appropriate isotype-matched antibodies (Abs) were used as controls. After 48h of culture in the different L-Arg media, the same number of viable NK-92 or *ex vivo* human NK cells ($2 \cdot 10^5$ cells) was labeled with these Abs. To quantify intracellular ζ chain expression, NK-92 and *ex vivo* human NK cells were previously fixed and permeabilized using an IntraPrep Fix/Perm kit (Beckman Coulter) before Abs staining. Two stimulation conditions were used for intracellular IFN-γ expression. After a 48 h incubation period at the various L-Arg concentrations, NK-92 cells were stimulated at 37°C for 4 h by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA; 0.2 µg/mL; Sigma) and ionomycin (0.5 µg/mL, Sigma) or by target cells (K562-EGFP) at a 5:1 effector-to-target ratio in presence of GolgiStop protein transport inhibitor (BD Cytofix/ Cytoperm Plus Fixation / Permeabilization Kit, BD Biosciences). NK-92 cells were then fixed and permeabilized using the same kit, and stained with anti-IFN-γ-PE (Beckman Coulter). CD25, ζ chain, CD335 (NKp46), CD337 (NKp30) and γ-IFN expression levels were analyzed by flow cytometry. Data

obtained were expressed as percentage of positive NK cells and as MFI reflecting density per cell.

Quantitative real time PCR analysis of L-Arg transporters and enzymes

NK-92 cells were harvested after 24 or 48 h culture in media containing different concentrations of L-Arg, and total RNA was isolated using TRIzol® Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed on 1 µg of total RNA, giving rise to 20 µL of cDNA as previously described [33]. One µL was used for the PCR performed in real-time on a LightCycler Instrument (Roche Diagnostics; Table 1). Sample mRNA copy numbers were extrapolated from standard curves obtained with serially diluted purified PCR products. mRNA levels of L-Arg transporters (CAT) and metabolizing enzymes (arginase I and II, ODC, ornithine amino transferase (OAT), iNOS, endothelial NOS (eNOS)) were normalized to match 18S, and then rationed to the Δ CT of gene expression in L-Arg-free cultured cells.

Isolation and cytotoxicity of ex vivo human NK cells

Human PBMCs were obtained from six healthy donors who had given prior consent. EDTA-blood cells were separated on a polymorphprep density gradient (Axis-Shield). Human NK cells were isolated by negative selection (NK Cell Isolation Kit, Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's protocol. Purity of NK cells was more than 90%, in accordance with the literature [34]. These cells were cultured for 48 h in media containing different concentrations of L-Arg (none, 2.5, 5, 15 (control) and 200 mg/L) at a density of $1 \cdot 10^5$ cells/mL. Cytotoxicity was determined as described above with $5 \cdot 10^5$ NK cells and $1 \cdot 10^5$ K562-EGFP cells.

Statistical analysis

All results are presented as means \pm SEM. Statistical analysis was performed by one-way ANOVA followed by a Fischer post-hoc test on STATVIEW 5.0 software, SAS Institute. Different letters show significant differences between two groups at $p < 0.05$. For mRNA expression, data reported as means \pm SEM were analyzed using a Student's *t* test to compare gene expression of NK-92 cells cultured with 15 mg/L of L-Arg, used as control, to the other conditions. * $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Results

L-Arg depletion decreases NK-92 cell proliferation and viability

As shown in Fig. 1A, at 48 h, NK-92 cell proliferation was significantly inhibited by the total L-Arg depletion and the lowest L-Arg concentration (2.5 mg/L) but it was maintained at other L-Arg concentrations (5, 15 and 200 mg/L). In the absence of L-Arg, cell viability was significantly decreased after 48 h of culture (Fig. 1B). Moreover, the percentage of NK-92 cells in sub-G1 phase was increased significantly after 48 h of culture (Fig 1C) confirming that the viability of NK-92 cells was reduced in the absence of L-Arg. The other cell cycle phases were not modulated whatever the L-Arg concentration (Fig 1C). Furthermore, CD25 cell surface expression of the α -chain IL-2 receptor did not change in response to the different L-Arg concentrations (mean value of $57.6 \pm 1\%$).

L-Arg depletion reduces NK cell cytotoxic activity

After 48 h of culture, L-Arg deprivation induced a dose-dependent inhibition of NK-92 cell cytotoxicity compared to controls (Fig. 2A). The absence of L-Arg is associated with a significant reduction by 80% of NK cell cytotoxicity ($p < 0.05$ versus other L-Arg concentration). L-Arg at 2.5 mg/L led to a 21% of decrease in the lytic activity while L-Arg at 5 mg/L did not alter the NK function after 48 h of incubation. Concentrations higher than 5 mg/L had no additional effect on NK-92 cell cytotoxicity. Our data demonstrate that L-Arg concentrations higher than 5 mg/L did not increase further NK-92 cell lytic activity whereas L-Arg concentrations lower than 5 mg/L inhibited it. The effect of L-Arg deficiency was also evaluated on *ex vivo* isolated human NK cells. Whatever the L-Arg concentration tested, lytic activity levels of human NK cells were similar to those observed with the NK-92 cell line. After 48 h of culture, total absence or 2.5 mg/L of L-Arg significantly reduced the lytic activity of *ex vivo* human NK cells (Fig. 2B).

L-Arg depletion reduces the expression of NK-92 NKp46 and NKp30 activating receptors

NKp46 and NKp30 expression were analyzed to study whether Natural Cell Receptor recognition was compromised by low L-Arg exposure (Fig. 3). The proportion of NK-92 cells expressing these receptors was modulated by L-Arg in a dose-dependent manner (Fig. 3C and 3D). Few cells ($< 1\%$) expressed NKp46 receptors under total L-Arg depletion or in the presence of the lowest L-Arg concentration, suggesting that L-Arg was indispensable to NKp46 expression. NK-92 cells began expressing NKp46 at a concentration of 5 mg/L L-Arg, but peak expression was obtained at 15 mg/L of L-Arg. However, around 30% of NK-92 cells expressed NKp30 receptor under total L-Arg depletion, suggesting that L-Arg was not indispensable to

NKp30 expression. As shown in Fig. 3E and 3F, NKp46 receptor density per cell remained unaffected whatever the L-Arg concentration tested while for the NKp30 receptor, it was significantly reduced for L-Arg concentrations under the physiological one.

L-Arg total depletion decreases NK ζ chain expression

In the absence of L-Arg, the proportion of NK-92 cells positive for the ζ chain was significantly decreased (from 70% to 35%, $p < 0.05$) (Fig. 4B). However, it is remarkable that the fluorescence intensity per cell was similar whatever the conditions tested (Fig. 4D). As shown in Fig. 4E, ζ chain density per NK cell was decreased in human isolated NK cells in total absence of L-Arg or at the L-Arg concentration of 2.5 mg/L compared to the physiological condition. However, the proportion of ζ chain positive NK cells remained unchanged, regardless of the L-Arg concentration tested (Fig. 4C), in contrast to NK-92 cells.

L-Arg depletion lowers intracellular NK-92 IFN- γ production

As shown in Fig. 5A and 5B, the total absence or 2.5 mg/L of L-Arg significantly decreased the proportion of IFN- γ expressing NK-92 cells regardless of the stimulating agents used i.e. cancerous target cells (K562) or PMA plus ionomycin. The proportion of IFN- γ -expressing NK-92 cells was maintained at the other L-Arg concentrations (5, 15 and 200 mg/L), whatever the stimulating conditions. Moreover, as shown by mean fluorescent intensity (MFI) (Fig. 5D), IFN- γ production was reduced in NK-92 cells in the absence of L-Arg after PMA and ionomycin stimulation but not after stimulation with target K562 cells (Fig. 5C).

L-Arg depletion does no modulate NK-92 gene expression of L-Arg transporters and enzymes

Whatever the culture time or L-Arg concentration tested, mRNA levels of L-Arg transporters and enzymes were not significantly different from those obtained for cells cultured in physiological concentration (i.e. 15 mg/L of L-Arg (Fig. 6)). However, in the presence of 2.5 mg/L of L-Arg, the transcription of *Cat 1*, *Cat 2b*, *eNOS*, *arginase 1* and *ODC* gene expression tended to increase.

Discussion

Several immune dysfunctions have been associated with changes in L-Arg metabolism. L-Arg depletion is reported in cancer patients in both circulating blood [12] and in tumor [11, 35]. This L-Arg depletion profoundly suppresses T cell functions [11, 13-16], but its effects on NK cells are poorly characterized. In our experimental conditions, L-Arg availability modulated differently the NK cells functions. Low L-Arg concentrations significantly decreased NK-92 cell growth, while a total L-Arg depletion strongly reduced growth and viability without abolishing them. Impaired proliferation of primary or activated human NK cells has been attributed to L-Arg depletion by polymorphonuclear granulocyte arginase [28]. This effect was independent of NK cell viability [28]. The reduced proliferation of NK-92 cells was not due to a low percentage of CD25 expressing cells and not to a cell cycle arrest in the G0-G1 phase in contrast to that reported in T lymphocytes [10, 11, 14].

For both type of NK cells studied, L-Arg deficiency inhibited cytotoxicity without totally abolishing it. Similarly, L-Arg limitation alters the cytotoxicity of human NK cells isolated from healthy subjects [29], and impaired NK-cell cytotoxicity has been also reported in human NK cell lines cultured in L-Arg-free medium [36]. In contrast, Oberlies *et al.* [28] showed that human NK cytotoxicity was independent of extracellular L-Arg. These conflicting results may be linked to the different experimental conditions and methods used e.g. NK cell source (IL-2-dependent or -independent cell lines *vs* spleen *vs* blood), purity (unpurified *vs* highly-purified), L-Arg availability (L-Arg-free medium *vs* arginase-induced L-Arg depletion *vs* preincubated medium *vs* low or high L-Arg concentrations) and methods to assess cytotoxicity (standard ^{51}Cr release assay *vs* flow cytometry). The 48-72 h preincubation might best explain the discrepancy of our results with these reported by Oberlies *et al.* [28].

We hypothesized that L-Arg depletion mediated decrease in cytotoxicity may be associated with impaired or reduced recognition of target cells by NKp46 and NKp30 activating receptors. Here, we report for the first time that L-Arg is necessary for NK-92 cell expression of NKp46. NKp46 receptor density was not modulated by L-Arg depletion whereas the percentage of NK-92 cells expressing NKp46 was decreased with low L-Arg concentrations. Thus, NK-92 cells expressing NKp46 receptor have on their surface the same amount of NKp46 receptors and some NK-92 cells don't possess this receptor. Moreover, low L-Arg concentrations were associated with a weak proportion of NK-92 cells expressing NKp30 receptors and with weak NKp30 receptor density. All together, these data suggest that the altered lytic function of NK-92 cells observed in L-Arg depletion may be at least partially mediated by NKp30 receptor. So the L-Arg-depletion induces altered NK cytotoxicity through a lower recognition of target cells by NKp46 and NKp30 activating receptors.

The low expression of these two activating receptors was also associated with downregulated expression of the ζ chain, which is a critical signaling element of NKp30 and NKp46 receptors. Some cancers, infections or autoimmune diseases are associated with downregulation of ζ chain expression in T and NK cells [17]. Moreover, impaired or reduced ζ chain expression in response to low L-Arg availability has been previously reported in T cells [1, 8, 11, 15, 16, 37], but not in NK cells. In our experimental conditions, subphysiological concentrations of L-Arg reduced the proportion of NK-92 cells expressing the ζ chain without affecting mean production. Conversely, L-Arg deficiency had no effect on the proportion of *ex vivo* human NK expressing the ζ chain but reduced mean ζ chain production. These differences might be due to the high proliferative activity and NO production of the NK-92 cells compared to human isolated NK. Indeed, unlike human isolated NK cells that express only eNOS mRNA [36], we have shown for the first time that NK-92 cell line expresses both eNOS and iNOS mRNA. It has been demonstrated that endogenous NO production protects human isolated NK cells from apoptosis and maintains lytic capacity [36]. Although NO is involved in different signaling pathways [38] its potential role in the modulation of the ζ chain by L-Arg is unknown.

Thus, L-Arg availability might control NK cell cytotoxic activity by modulating the transmission of activating signals *via* the ζ chain. How L-Arg availability selectively downregulates the ζ chain is still unclear, but may involve an enhanced proteosomal or lysosomal degradation of ζ chain and/or a decrease in protein synthesis [15, 16].

L-Arg depletion altered not only NK cell proliferation and cytotoxicity but also IFN- γ production. NK-92 cell expression of IFN- γ was downregulated under total L-Arg depletion or at low L-Arg concentrations (2.5 mg/L) whatever the stimulating conditions. Total L-Arg depletion also decreased NK-92 mean production of IFN- γ after PMA and ionomycin stimulation but not after K562-EGFP stimulation, whatever the L-Arg concentration tested. This difference could be due to the fact that pharmacological stimulation *via* PMA and ionomycin probably activates other signaling pathways that K562-EGFP cell stimulation is unable to activate. Low production of IFN- γ in T lymphocytes after L-Arg starvation has been related [16] or not [13] to decreased IFN- γ mRNA expression. NK cells are the major cellular source of IFN- γ , which triggers innate and adaptive immunity and participates in NK activity [39, 40]. IFN- γ can also directly affect a wide range of tumor cells, by decreasing their proliferation and metabolic activities and by inhibiting angiogenesis [41, 42]. It may also play a role in the regulation of death receptor-dependent apoptosis [43, 44].

In our experimental conditions, the NK-92 mRNA expression of genes involved in L-Arg transport and metabolism was slightly affected by L-Arg availability. Arginine deficiency tended to increase mRNA expression of CAT 1, CAT 2B, arginase I, endothelial NOS (eNOS)

and ODC without significant changes in iNOS or ornithine amino transferase (OAT) gene expression. As expected, L-Arg depletion stimulated L-Arg transporter expression. The response of CAT 1 could involve concomitant increases in transcription *via* eukaryotic initiation factor 2 alpha signaling, mRNA stability, and translation [45]. CAT 2B is required for sustained NO production, as shown in inflammatory peritoneal macrophages [3] and IL-2 activates the CAT 2B transcript in lymphocytes [46]. We also showed that human NK-92 cell line constitutively expresses both eNOs and iNOS mRNA while others NK cell lines such as NK3.3 and YT and human isolated NK cells express eNOS but not iNOS mRNA and proteins [36]. In response to L-Arg deficiency, NK-92 cell Arg metabolism seems directed towards polyamine synthesis *via* eNOS/arginase I/ODC. Further investigations are needed to identify the preferential L-Arg degradation pathway in this setting. Post-transcriptional modulation and/or variation in enzyme activities could be involved in the potential L-Arg signaling effects on NK-92 cell functionality.

In summary, these data extend previous observations on the L-Arg deficiency induced altered NK cell proliferation, cytotoxicity and IFN- γ production but also show, for the first time, a reduction of NKp46, NKp30 and ζ chain expression. These findings provide insight into the altered lytic activity of NK cells in pathological situations, as a consequence of a local or systemic reduced L-Arg availability and highlight the importance of adequate availability of some nutrients to optimize immune body defense. The mechanisms underlying L-Arg involved in expression of IFN- γ , NKp46, NKp30 and ζ chain on NK cells remain to be explored.

Acknowledgments

This work was supported by funding from the *Ligue Nationale Contre le Cancer*; a doctoral fellowship (CPER and FEDER 2008) and the *Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche* EA4233. The authors thank Pr E. Vivier (Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Université de la Méditerranée) for providing the NK-92 cell line, Dr C. Lambert (Département d'Immunologie, CHU Saint-Etienne) for his expertise in flow cytometry, and S. Rougé (Laboratoire de Biochimie, Biologie Moléculaire et Nutrition, UFR de Pharmacie, Université d'Auvergne Clermont-1) for her technical assistance.

References

- [1] V. Bronte, P. Zanovello, Regulation of immune responses by L-arginine metabolism, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 641-654.
- [2] E. Peranzoni, I. Marigo, L. Dolcetti, S. Ugel, N. Sonda, E. Taschin, B. Mantelli, V. Bronte, P. Zanovello, Role of arginine metabolism in immunity and immunopathology, *Immunobiology* 212 (2007) 795-812.
- [3] B. Nicholson, C.K. Manner, J. Kleeman, C.L. MacLeod, Sustained nitric oxide production in macrophages requires the arginine transporter CAT2, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 15881-15885.
- [4] A. Yeramian, L. Martin, N. Serrat, L. Arpa, C. Soler, J. Bertran, C. McLeod, M. Palacin, M. Modolell, J. Lloberas, A. Celada, Arginine transport via cationic amino acid transporter 2 plays a critical regulatory role in classical or alternative activation of macrophages, *J. Immunol.* 176 (2006) 5918-5924.
- [5] M. Hesse, M. Modolell, A.C. La Flamme, M. Schito, J.M. Fuentes, A.W. Cheever, E.J. Pearce, T.A. Wynn, Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism, *J. Immunol.* 167 (2001) 6533-6544.
- [6] M. Munder, K. Eichmann, J.M. Moran, F. Centeno, G. Soler, M. Modolell, Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells, *J. Immunol.* 163 (1999) 3771-3777.
- [7] M. Munder, Arginase: an emerging key player in the mammalian immune system, *Br. J. Pharmacol.* 158 (2009) 638-651.
- [8] P.C. Rodriguez, A.C. Ochoa, Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives, *Immunol. Rev.* 222 (2008) 180-191.
- [9] P. Serafini, I. Borrello, V. Bronte, Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression, *Semin. Cancer Biol.* 16 (2006) 53-65.
- [10] A. Viola, V. Bronte, Metabolic mechanisms of cancer-induced inhibition of immune responses, *Semin. Cancer Biol.* 17 (2007) 309-316.
- [11] P.C. Rodriguez, D.G. Quiceno, J. Zabaleta, B. Ortiz, A.H. Zea, M.B. Piazuelo, A. Delgado, P. Correa, J. Brayer, E.M. Sotomayor, S. Antonia, J.B. Ochoa, A.C. Ochoa, Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses, *Cancer Res.* 64 (2004) 5839-5849.
- [12] Y.L. Vissers, C.H. Dejong, Y.C. Luiking, K.C. Fearon, M.F. von Meyenfeldt, N.E. Deutz, Plasma arginine concentrations are reduced in cancer patients: evidence for arginine deficiency?, *Am. J. Clin. Nutr.* 81 (2005) 1142-1146.
- [13] M. Munder, H. Schneider, C. Luckner, T. Giese, C.D. Langhans, J.M. Fuentes, P. Kropf, I. Mueller, A. Kolb, M. Modolell, A.D. Ho, Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase, *Blood* 108 (2006) 1627-1634.
- [14] P.C. Rodriguez, D.G. Quiceno, A.C. Ochoa, L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression, *Blood* 109 (2007) 1568-1573.

- [15] P.C. Rodriguez, A.H. Zea, J. DeSalvo, K.S. Culotta, J. Zabaleta, D.G. Quiceno, J.B. Ochoa, A.C. Ochoa, L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes, *J. Immunol.* 171 (2003) 1232-1239.
- [16] A.H. Zea, P.C. Rodriguez, K.S. Culotta, C.P. Hernandez, J. DeSalvo, J.B. Ochoa, H.J. Park, J. Zabaleta, A.C. Ochoa, L-Arginine modulates CD3zeta expression and T cell function in activated human T lymphocytes, *Cell. Immunol.* 232 (2004) 21-31.
- [17] M. Baniyash, TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response, *Nat. Rev. Immunol.* 4 (2004) 675-687.
- [18] E. Vivier, E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, S. Ugolini, Functions of natural killer cells, *Nat. Immunol.* 9 (2008) 503-510.
- [19] L.L. Lanier, NK cell recognition, *Annu. Rev. Immunol.* 23 (2005) 225-274.
- [20] N. Bloushtain, U. Qimron, A. Bar-Ilan, O. Hershkovitz, R. Gazit, E. Fima, M. Korc, I. Vlodavsky, N.V. Bovin, A. Porgador, Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46, *J. Immunol.* 173 (2004) 2392-2401.
- [21] T.I. Arnon, M. Lev, G. Katz, Y. Chernobrov, A. Porgador, O. Mandelboim, Recognition of viral hemagglutinins by NKp44 but not by NKp30, *Eur. J. Immunol.* 31 (2001) 2680-2689.
- [22] O. Mandelboim, N. Lieberman, M. Lev, L. Paul, T.I. Arnon, Y. Bushkin, D.M. Davis, J.L. Strominger, J.W. Yewdell, A. Porgador, Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells, *Nature* 409 (2001) 1055-1060.
- [23] C.S. Brandt, M. Baratin, E.C. Yi, J. Kennedy, Z. Gao, B. Fox, B. Haldeman, C.D. Ostrander, T. Kaifu, C. Chabannon, A. Moretta, R. West, W. Xu, E. Vivier, S.D. Levin, The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans, *J. Exp. Med.* 206 (2009) 1495-1503.
- [24] L.L. Lanier, Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition, *Nat. Immunol.* 9 (2008) 495-502.
- [25] N.L. Vujanovic, S. Yasumura, H. Hirabayashi, W.C. Lin, S. Watkins, R.B. Herberman, T.L. Whiteside, Antitumor activities of subsets of human IL-2-activated natural killer cells in solid tissues, *J. Immunol.* 154 (1995) 281-289.
- [26] M.A. Caligiuri, A. Zmuidzinas, T.J. Manley, H. Levine, K.A. Smith, J. Ritz, Functional consequences of interleukin 2 receptor expression on resting human lymphocytes. Identification of a novel natural killer cell subset with high affinity receptors, *J. Exp. Med.* 171 (1990) 1509-1526.
- [27] B.S. Choi, I.C. Martinez-Falero, C. Corset, M. Munder, M. Modolell, I. Muller, P. Kropf, Differential impact of L-arginine deprivation on the activation and effector functions of T cells and macrophages, *J. Leukoc. Biol.* 85 (2009) 268-277.
- [28] J. Oberlies, C. Watzl, T. Giese, C. Luckner, P. Kropf, I. Muller, A.D. Ho, M. Munder, Regulation of NK cell function by human granulocyte arginase, *J. Immunol.* 182 (2009) 5259-5267.
- [29] L. Xiao, P.H. Eneroth, G.A. Qureshi, Nitric oxide synthase pathway may mediate human natural killer cell cytotoxicity, *Scand. J. Immunol.* 42 (1995) 505-511.

- [30] J.H. Gong, G. Maki, H.G. Klingemann, Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells, *Leukemia* 8 (1994) 652-658.
- [31] E.M. Czekanska, Assessment of cell proliferation with resazurin-based fluorescent dye, *Methods Mol. Biol.* 740 (2011) 27-32.
- [32] S. Allegra, C. Deleine, R. Michael-Jubely, C. Gryson, Y. Boirie, W. Kantakamalakul, M.P. Vasson, Implementation of the EGFP-K562 flow cytometric NK test: determination of NK cytotoxic activity in healthy elderly volunteers before and after feeding, *Cytometry A* 69 (2006) 992-998.
- [33] E. Merlin, N. Goncalves-Mendes, D. Hannani, A. de la Torre, M.C. Farges, H. Laroye, F. Demeocq, J. Kanold, M.P. Vasson, Extracorporeal photochemotherapy induces arginase 1 in patients with graft versus host disease, *Transpl. Immunol.* 24 (2011) 100-106.
- [34] H. Li, Y. Han, Q. Guo, M. Zhang, X. Cao, Cancer-expanded myeloid-derived suppressor cells induce anergy of NK cells through membrane-bound TGF-beta 1, *J. Immunol.* 182 (2009) 240-249.
- [35] A.H. Zea, P.C. Rodriguez, M.B. Atkins, C. Hernandez, S. Signoretti, J. Zabaleta, D. McDermott, D. Quiceno, A. Youmans, A. O'Neill, J. Mier, A.C. Ochoa, Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion, *Cancer Res.* 65 (2005) 3044-3048.
- [36] K. Furuke, P.R. Burd, J.A. Horvath-Arcidiacono, K. Hori, H. Mostowski, E.T. Bloom, Human NK cells express endothelial nitric oxide synthase, and nitric oxide protects them from activation-induced cell death by regulating expression of TNF-alpha, *J. Immunol.* 163 (1999) 1473-1480.
- [37] F. Taheri, J.B. Ochoa, Z. Faghiri, K. Culotta, H.J. Park, M.S. Lan, A.H. Zea, A.C. Ochoa, L-Arginine regulates the expression of the T-cell receptor zeta chain (CD3zeta) in Jurkat cells, *Clin. Cancer Res.* 7 (2001) 958s-965s.
- [38] C. Bogdan, Nitric oxide and the immune response, *Nat. Immunol.* 2 (2001) 907-916.
- [39] R.J. Critchley-Thorne, D.L. Simons, N. Yan, A.K. Miyahira, F.M. Dirbas, D.L. Johnson, S.M. Swetter, R.W. Carlson, G.A. Fisher, A. Koong, S. Holmes, P.P. Lee, Impaired interferon signaling is a common immune defect in human cancer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (2009) 9010-9015.
- [40] T. Strowig, F. Brilot, C. Munz, Noncytotoxic functions of NK cells: direct pathogen restriction and assistance to adaptive immunity, *J. Immunol.* 180 (2008) 7785-7791.
- [41] H. Ikeda, L.J. Old, R.D. Schreiber, The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting, *Cytokine Growth Factor Rev.* 13 (2002) 95-109.
- [42] S.E. Street, E. Cretney, M.J. Smyth, Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis, *Blood* 97 (2001) 192-197.
- [43] T.S. Griffith, W.A. Chin, G.C. Jackson, D.H. Lynch, M.Z. Kubin, Intracellular regulation of TRAIL-induced apoptosis in human melanoma cells, *J. Immunol.* 161 (1998) 2833-2840.
- [44] M. Irmeler, M. Thome, M. Hahne, P. Schneider, K. Hofmann, V. Steiner, J.L. Bodmer, M. Schroter, K. Burns, C. Mattmann, D. Rimoldi, L.E. French, J. Tschopp, Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP, *Nature* 388 (1997) 190-195.
- [45] M. Hatzoglou, J. Fernandez, I. Yaman, E. Closs, Regulation of cationic amino acid transport: the story of the CAT-1 transporter, *Annu. Rev. Nutr.* 24 (2004) 377-399.

[46] B.R. Stevens, M. Tellier, W. Harvey, D.H. Feldman, J. Bosworth, Interleukin-2 and concanavalin A upregulate a cat2 isoform encoding a high affinity L-arginine transporter in feline lymphocytes, *Can. J. Vet. Res.* 64 (2000) 187-191.

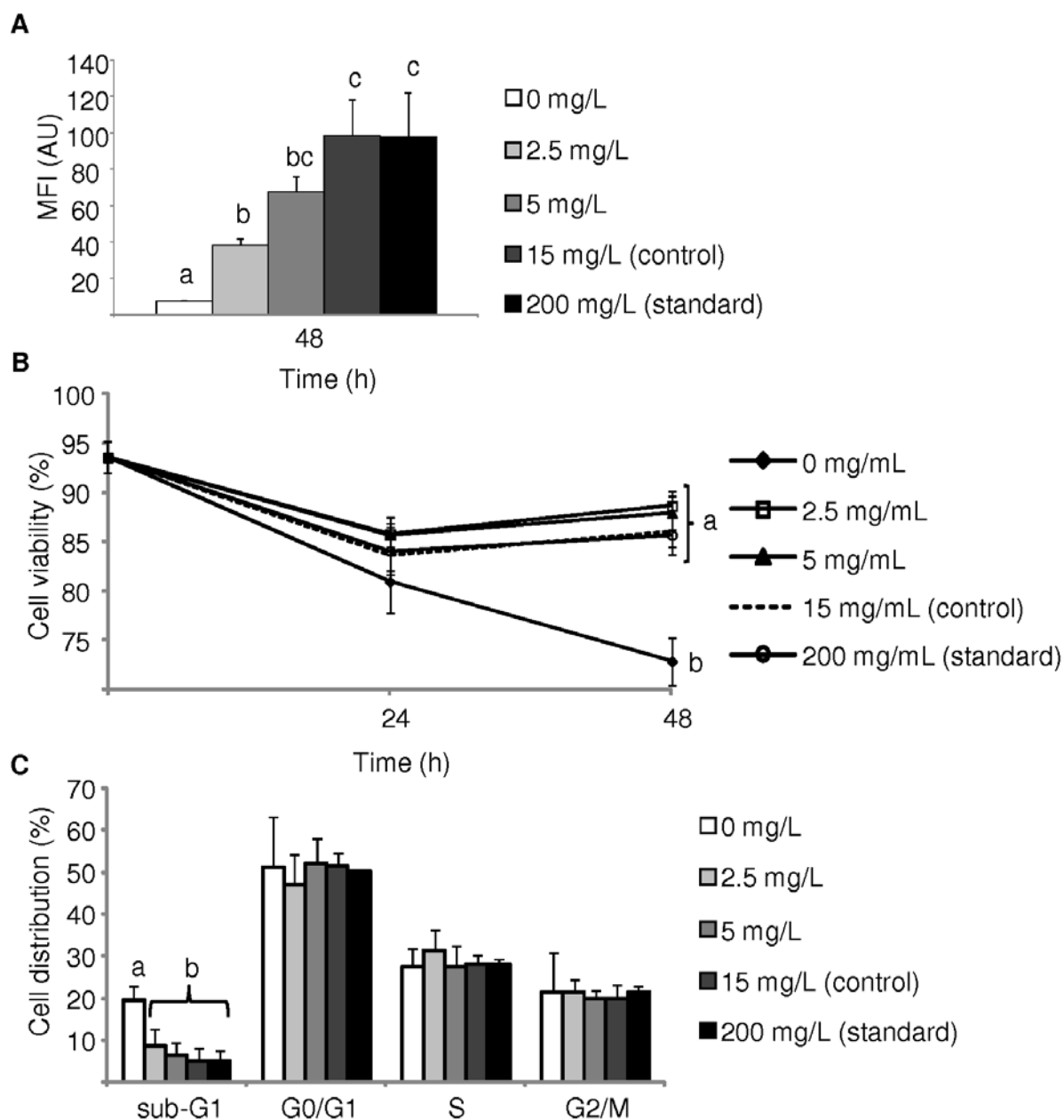


Figure 1. L-Arg effects on NK-92 cell proliferation, viability and cell cycle

NK-92 cells were cultured for 48 h on arginine-free RPMI supplemented with different concentrations of L-Arg (none, 2.5, 5, 15 (control) and 200 mg/L) in the presence of IL-2 (200 U/mL). Cell viability was determined every 24 h while cell proliferation and cell cycle were measured after 48 h of culture. (A) Cell proliferation (MFI: mean fluorescence intensity). (B) Cell viability. (C) Cell cycle. Data are means \pm SEM of 4 independent experiments performed in triplicate. One-way ANOVA plus PSLF Fischer post-hoc test, $a \neq b \neq c$, $p < 0.05$.

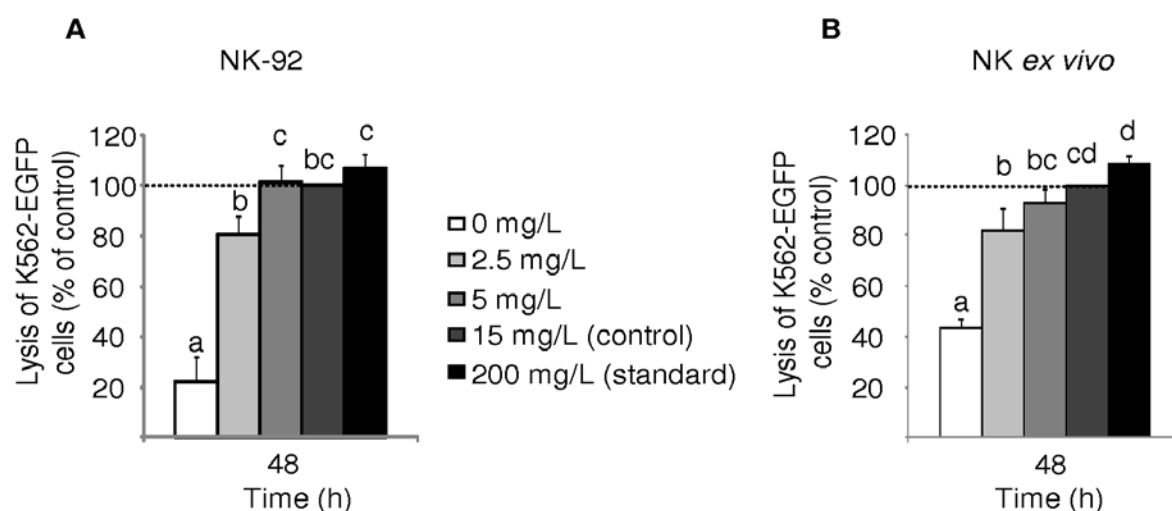


Figure 2. L-Arg effects on NK cell cytotoxicity against K562-EGFP cells

NK-92 and *ex vivo* isolated human NK cells were first cultured for 48 h in media containing different concentrations of L-Arg (none, 2.5, 5, 15 (control) and 200 mg/L) and then incubated with target cells (K562-EGFP) at a 5:1 effector-to-target ratio, for 4 h. Cytotoxic activity was evaluated by flow cytometry using PI staining. (A) NK-92 cell cytotoxicity against K562-EGFP cells. (B) *Ex vivo* isolated human NK cell cytotoxicity against K562-EGFP. Six assays were performed in triplicate and are presented as means \pm SEM. One-way ANOVA plus PSLF Fischer post-hoc test, $a \neq b \neq c \neq d$, $p < 0.05$.

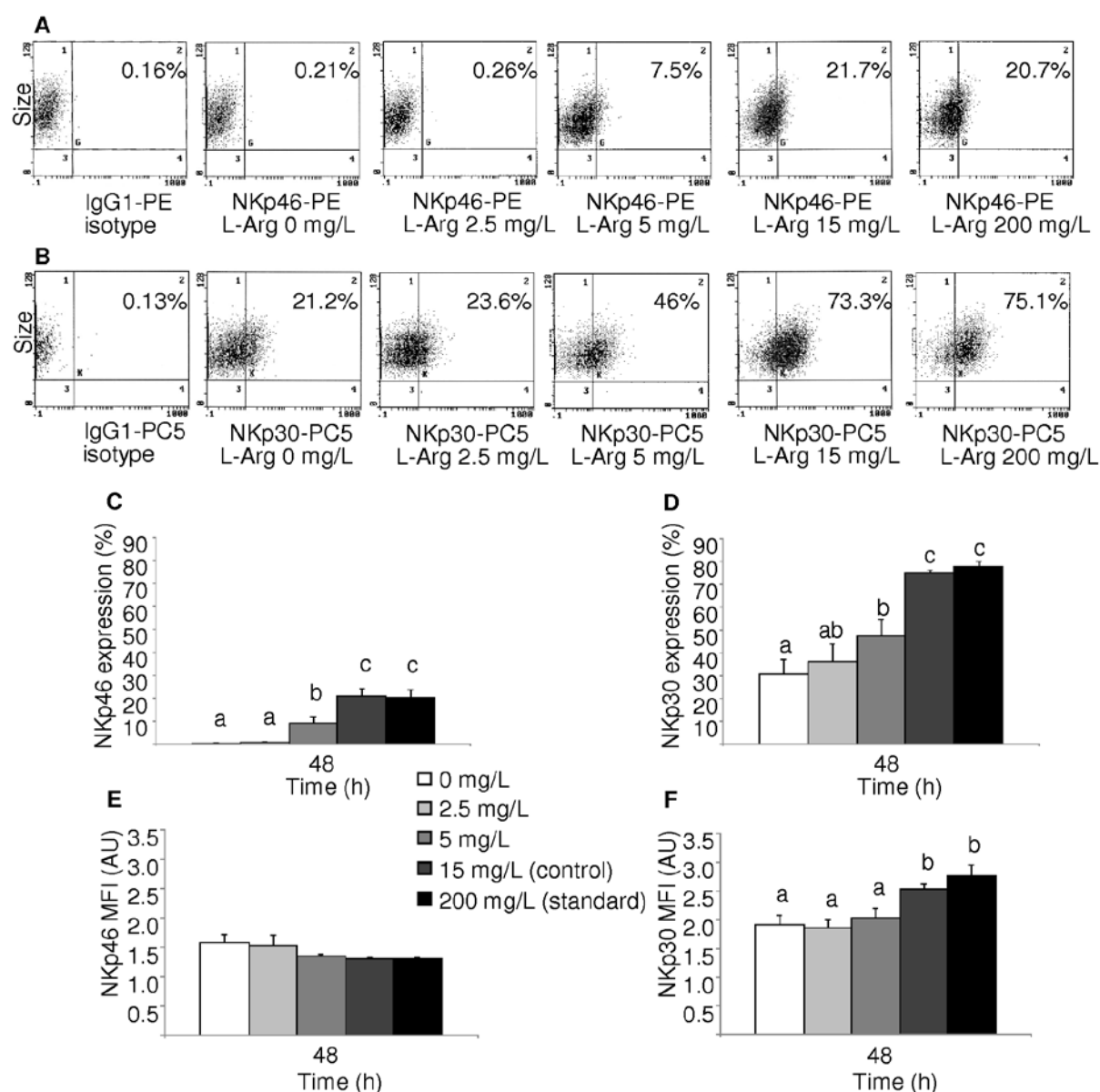


Figure 3. L-Arg effects on NKp46 and NKp30 expression in NK-92 cells

After 48 h of culture in media containing different concentrations of L-Arg (none, 2.5, 5, 15 (control) and 200 mg/L), NKp46 and NKp30 expression by NK-92 cells was studied using specific staining with anti-CD335 (NKp46)-PE or anti-CD337 (NKp30)-PC5 antibody. Flow cytometry plots of 1 independent experiment representing. The right side of the flow cytometry plot represents the percentage of NK-92 cells stained by (A) anti-CD335 (NKp46)-PE antibody and (B) anti-CD337 (NKp30)-PC5 antibody. (C) Percentage of NK-92 cells expressing NKp46. (D) Percentage of NK-92 cells expressing NKp30. (E) MFI of NK-92 cells expressing NKp46. (F) MFI of NK-92 cells expressing NKp30. Data are given as means \pm SEM of 3 experiments repeated three time. One-way ANOVA plus PSLF Fischer post-hoc test, $a \neq b \neq c$, $p < 0.05$.

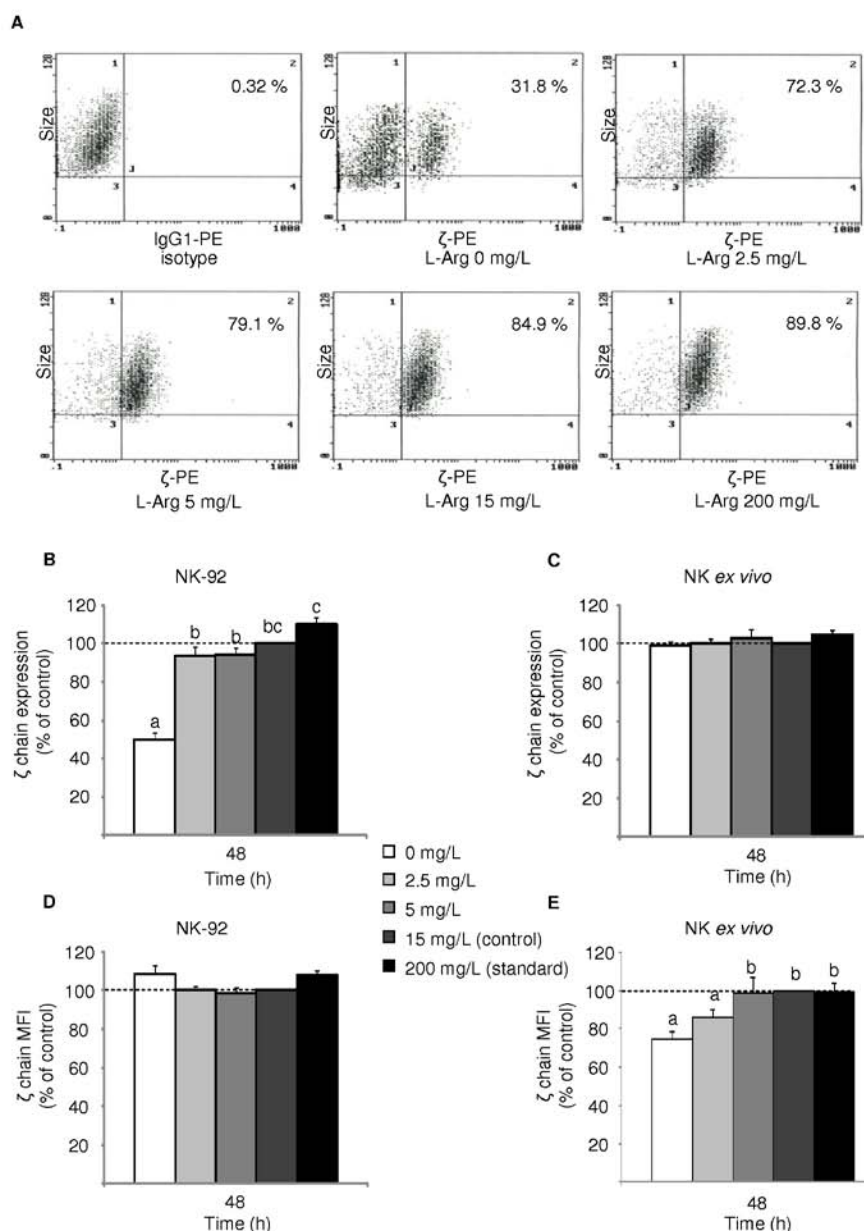


Figure 4. L-Arg effects on NK cell ζ chain expression

After 48 h of culture in media containing different concentrations of L-Arg (none, 2.5, 5, 15 (control) and 200 mg/L), NK-92 and *ex vivo* isolated human NK cells were fixed and permeabilized before staining using anti- ζ -PE antibody. (A) Flow cytometry plots of one independent experiment. The right side of the flow cytometry plot represents the percentage of NK-92 cells stained by anti- ζ -PE antibody. (B) Percentage of NK-92 cells expressing the ζ chain. (C) Percentage of *ex vivo* isolated human NK cells expressing the ζ chain. (D) MFI of NK-92 cells expressing the ζ chain. (E) MFI of *ex vivo* isolated human NK cells expressing the ζ chain. Data are presented as means \pm SEM of 6 assays performed in triplicate for NK-92 cells while results are expressed as means \pm SEM of 3 independent experiments repeated 3 times for *ex vivo* NK cells. One-way ANOVA plus PSLF Fischer post-hoc test, $a \neq b \neq c$, $p < 0.05$.

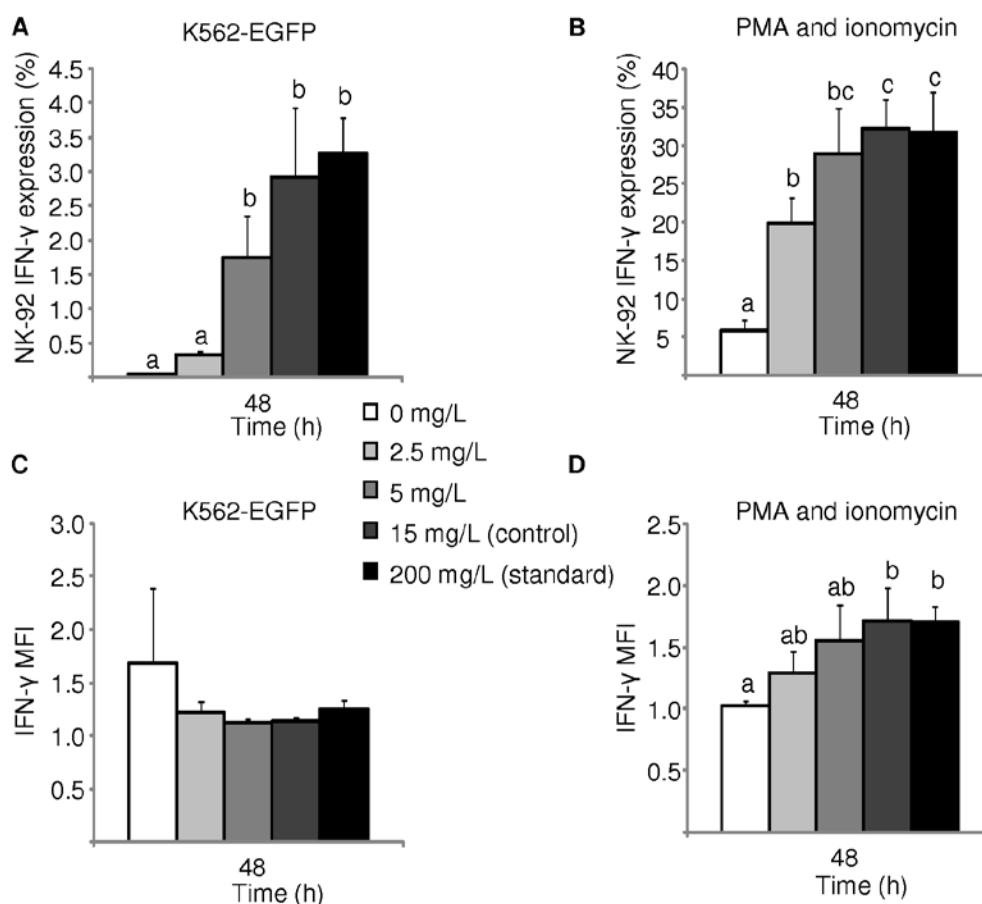


Figure 5. L-Arg effects on IFN- γ expression in NK-92 cells

After 48 h of culture in media containing different concentrations of L-Arg (none, 2.5, 5, 15 (control) and 200 mg/L), NK-92 cells were stimulated either by co-culture with target K562-EGFP cells or by PMA and ionomycin for 4 h in presence of the GolgiStop protein transport inhibitor (BD Biosciences). Cells were then fixed, permeabilized, and stained with anti-IFN- γ -PE antibody. (A) Percentage of NK-92 cells expressing IFN- γ after K562-EGFP stimulation. (B) Percentage of NK-92 cells expressing IFN- γ after PMA and ionomycin stimulation. (C) MFI of NK-92 cells expressing IFN- γ after K562-EGFP stimulation. (D) MFI of NK-92 cells expressing IFN- γ after PMA and ionomycin stimulation. Data presented as means \pm SEM result of 3 assays done in triplicate. One-way ANOVA plus PSLF Fischer post-hoc test, $a \neq b$, $p < 0.05$.

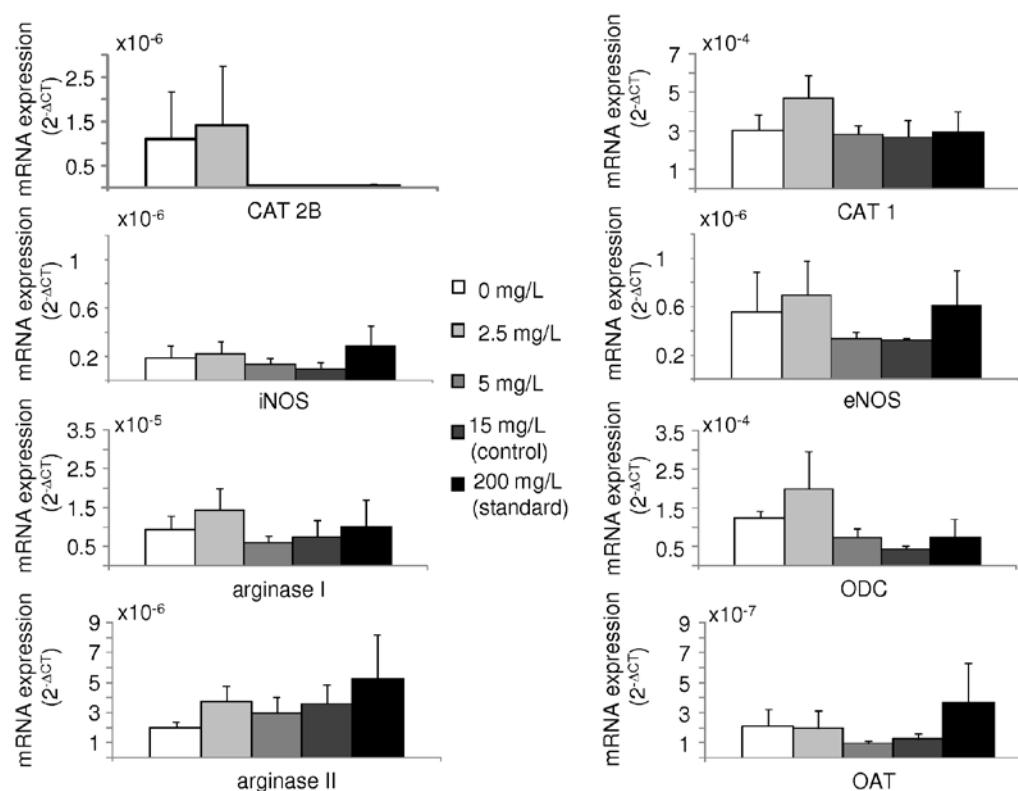


Figure 6. Differential gene expression of transporters and enzymes of L-Arg metabolism in NK-92 cells

After 48 h of culture in media containing different concentrations of L-Arg (none, 2.5, 5, 15 (control) and 200 mg/L), NK-92 cell mRNA expression of transporters and its metabolizing enzymes was quantified by RT-qPCR. The three experiments were performed in triplicate and the data are shown as means \pm SEM. Student's *t* test, $p > 0.05$ versus 15 mg/L.

Table I: Primer pairs used for q-RT-PCR analysis of NK-92 cell mRNA expression of genes implicated in L-Arg transport and metabolism

	forward	reverse
18S	5'-GTCTGTGATGCCCTTAGA-3'	5'-AGCTTATGACCCGCACTTAC-3'
CAT 1	5'-ATCTGCTTCATCGCCTACTT-3'	5'-TAGCAGTCCATCCTCAGCCATG-3'
CAT 2B	5'-CCCAATGCCTCGTGAATCT-3'	5'-TGCCACTGCACCCGATGATAAAGT-3'
iNOS	5'-CGGTGCTGTATTTCTTACGAGGCGAAGAAGG-3'	5'-GGTGCTGCTTGTAGGAGGTCAAGTAAAGGGC-3'
eNOS	5'-GAAGAGGAAGGAGTCCAGTAACA-3'	5'-GGACTTGCTGCTTTGCAGGTTTTC-3'
Arginase I	5'-CTTGTTTCGGACTTGCTCGG-3'	5'-CACTCTATGTATGGGGGCTTA-3'
Arginase II	5'-GACACTGCCCAGACCTTTGT-3'	5'-CGTTCCATGACCTTCTGGAT-3'
ODC	5'-AATCAACCCAGCGTTGGACAA-3'	5'-ACATCACATAGTAGATCGTCG-3'
OAT	5'-CTGCCGTAAGAGGAAAAGGA-3'	5'-GCTTGGCCAGAAGTCCATTA-3'

CAT, cationic amino acid transporter; ODC, ornithine decarboxylase; OAT, ornithine amino-transferase; iNOS, inducible nitric-oxide synthase; eNOS, endothelial nitric-oxide synthase.

Partie III Discussion

Discussion

Les cellules NK sont des acteurs majeurs de la vigilance anti-tumorale. Elles appartiennent à l'immunité innée par lyse directe des cellules cibles sans immunisation préalable (Zompi, S. and Colucci, F. 2005). Elles participent également à l'immunité adaptative par sécrétion de cytokines et par cytotoxicité médiée par les anticorps *via* leur CD16 qui se lie aux immunoglobulines de type G fixées à la surface des cellules cibles (Cullen, S.P. and Martin, S.J. 2008; Critchley-Thorne, R.J. et al. 2009).

La mort des cellules cibles est induite de façon i) dépendante ou ii) indépendante de la perforine. En effet, au contact de la cible la perforine et les granzymes, libérés des granules cytosoliques par exocytose, sont des effecteurs de la cytotoxicité. Indépendamment de la perforine, des ligands aux récepteurs de mort, Fas-L et TRAIL, exprimés à la surface des cellules NK, peuvent également induire la lyse cellulaire (Zompi, S. and Colucci, F. 2005).

La caractérisation fonctionnelle des cellules NK a permis d'identifier différents récepteurs capables d'inhiber ou de stimuler leur cytotoxicité tels que les KIR et les NCR (Vivier, E. 2006). Les cellules NK exercent leur activité lytique vis-à-vis de cellules cibles n'exprimant pas les molécules du CMH de classe I ou exprimant un CMH de classe I altéré. L'échappement tumoral est associé à une immunosuppression liée entre autres à une réduction du nombre et de l'activité fonctionnelle des cellules NK (Vivier, E. 2006).

Une alimentation hypercalorique induisant l'obésité module à la fois le développement tumoral mammaire (Hursting, S.D. and Berger, N.A. 2010; Roberts, D.L. et al. 2010) et le système immunitaire (Marti, A. et al. 2001; Karlsson, E.A. and Beck, M.A. 2010). Les personnes obèses présentent fréquemment une immunodéficience secondaire à une diminution du nombre des LT CD8 et des cellules NK et à une moindre cytotoxicité de ces dernières (Scanga, C.B. et al. 1998; O'Rourke, R.W. et al. 2005; Lynch, L.A. et al. 2009; O'Shea, D. et al. 2010). Il est intéressant de noter que le nombre de cellules NK au niveau sanguin est supérieur chez les personnes obèses sans syndrome métabolique comparativement à celles ayant un syndrome métabolique (Lynch, L.A. et al. 2009). De plus, les cellules NK prélevées chez des animaux rendus obèses par une alimentation hypercalorique et transférées chez des rats de poids normal tendent à retrouver une signalisation en aval du récepteur de la leptine identique à celle des cellules NK des rats non obèses (Lautenbach, A. et al. 2009). Ces données suggèrent qu'en situation d'obésité, la production de facteurs tels que des facteurs de croissance, des hormones (IGF-1), des cytokines (adipokines) sont susceptibles d'inhiber les cellules NK. Toutefois, il reste à déterminer comment une alimentation hypercalorique, sans induire de surpoids, peut réguler le développement tumoral mammaire et la fonctionnalité des cellules NK.

Plusieurs mécanismes permettent à la tumeur d'échapper ou d'interférer avec la réponse immune anti-tumorale. Ces mécanismes d'échappement peuvent être classés en différentes catégories, selon qu'ils sont inhérents aux cellules cancéreuses ou au micro-environnement tumoral ou encore aux effecteurs du système immunitaire. Des cytokines et des chimiokines pro-inflammatoires sécrétées par la tumeur ou les cellules environnantes entretiennent une réponse inflammatoire chronique empêchant ainsi la mise en place de la réponse immune anti-tumorale et favorisant l'accroissement des processus de transformation et de croissance des cellules malignes. La leptine, protéine sécrétée majoritairement par le tissu adipeux, est une composante majeure du stroma mammaire (Zhang, Y. et al. 1994; Woods, S.C. et al. 1998). Cette adipokine est capable de moduler la réponse des cellules immunocompétentes. Notre équipe a précédemment démontré que la leptine joue également un rôle dans le développement tumoral et en particulier, du cancer mammaire (Jarde, T. et al. 2008a; Jarde, T. et al. 2009). De fait, l'hyperleptinémie associée à l'obésité est positivement corrélée au risque de développer un cancer mammaire chez la femme ménopausée (Wu, M.H. et al. 2009). La présence du récepteur de la leptine a été caractérisée au niveau de cellules immunitaires tels que les lymphocytes T et B (Lord, G.M. et al. 1998; Martin-Romero, C. et al. 2000), les monocytes/macrophages (Zarkesh-Esfahani, H. et al. 2001) et les polynucléaires neutrophiles (Caldefie-Chezet, F. et al. 2003). Si les cellules NK possèdent également des récepteurs de la leptine (Zhao, Y. et al. 2003; Wrann, C.D. et al. 2012), les effets de cette adipokine sur leur fonctionnalité restent toutefois à caractériser.

Au niveau du micro-environnement tumoral, d'autres molécules telles que les enzymes indoléamine 2,3-dioxygénase (IDO) et arginase sont suspectées d'intervenir dans l'induction de la tolérance tumorale. Ces deux enzymes sont exprimées par de multiples types cellulaires en réponse à l'inflammation. L'action immunosuppressive de ces enzymes repose sur la réduction des concentrations locales en tryptophane et en arginine. L'expression de ces enzymes peut être induite par l'IFN- α et γ pour l'IDO et par le TNF- α pour l'arginase. Ainsi, en situation de cancer du sein, une déplétion en arginine est fréquemment rapportée (Visser, Y.L. et al. 2005) du fait d'une consommation accrue de cet acide aminé par l'arginase I des cellules suppressores dérivées des myéloïdes (MSDC) (Serafini, P. et al. 2006; Rodriguez, P.C. and Ochoa, A.C. 2008) et de la tumeur (Singh, R. et al. 2000). Cette déplétion en arginine induit une inhibition de la prolifération et de l'expression de la protéine signal ζ du TCR et bloque le cycle cellulaire des lymphocytes T en phase G0-G1 (Rodriguez, P.C. and Ochoa, A.C. 2008). A ce jour, peu de travaux se sont intéressés à l'impact d'une telle déplétion sur les cellules NK.

Dans ce contexte, l'objectif du travail de thèse était de caractériser l'activité fonctionnelle et métabolique des cellules NK en situation de stress nutritionnels. Dans un premier temps nous nous sommes intéressés à l'impact *in vivo* d'un régime hypercalorique sur le développement tumoral mammaire et l'activité des cellules NK. Dans un deuxième temps nous avons cherché à identifier et

comprendre les altérations fonctionnelles des cellules NK en mimant des conditions retrouvées dans le micro-environnement tumoral telles que l'excès de leptine et le déficit en arginine.

Au cours de la première étude, l'effet d'un régime hypercalorique sur le développement d'une lignée cancéreuse mammaire humaine a été évalué. Pour cela, des souris Balb-c « nude » femelles ont été randomisées en deux groupes : le premier a été soumis à un régime hypercalorique (HC : 5,32 kcal/g, L/G/P en % 36/35/18) et le second à un régime normocalorique (NC : 2,82 kcal/g, L/G/P en % 3/60/16) pendant 6 mois. Au bout de cinq mois, les animaux sont répartis en quatre groupes et des cellules tumorales mammaires humaines (MCF-7) (NCT ou HCT) ou le « véhicule » (NC, HC) ont été implantées au niveau de la quatrième paire de glande mammaire.

L'obésité est un facteur de risque reconnu de développer un cancer du sein exprimant les récepteurs des œstrogènes (RE) chez les femmes ménopausées (Carpenter, C.L. et al. 2003; Stephenson, G.D. and Rose, D.P. 2003; Reeves, G.K. et al. 2007). Par conséquent nous avons choisi d'utiliser une lignée cancéreuse mammaire (MCF-7) qui exprime ces récepteurs à la différence des études antérieures utilisant des cellules cancéreuses n'exprimant pas les RE (Rose, D.P. et al. 1991; Kim, E.J. et al. 2011).

Dans notre étude, les souris HC présentent une prise calorique (+32%) ainsi qu'une masse grasse significativement supérieure (+23%) aux souris NC sans pour autant développer de surpoids. La croissance tumorale sous régime HC est associée significativement à la diminution de la masse grasse (-26%), de la masse maigre (-11%) et du poids corporel (-8%), sans modification de la prise alimentaire. Conformément aux données de la littérature, le poids et le volume tumoral sont augmentés sous régime HC (Rose, D.P. et al. 1991; Gu, J.W. et al. 2011; Kim, E.J. et al. 2011). Toutefois, dans la littérature contrairement à nos observations, les animaux soumis à ces régimes ont un poids corporel significativement supérieur à celui des animaux soumis au régime contrôle (Gu, J.W. et al. 2011; Kim, E.J. et al. 2011). Cette discordance pourrait être due à la teneur en graisses des régimes utilisés. Généralement, ils contiennent de l'ordre de 60% de lipides alors que dans notre étude nous utilisons un régime composé de 36 % de lipides. De plus, les souris Balb-c répondent « faiblement » à une alimentation riche en graisses et sont connues pour être résistantes à l'obésité (Fearnside, J.F. et al. 2008; Olson, L.K. et al. 2010). Ces résultats montrent qu'un régime HC, sans induire de surpoids, stimule la prolifération tumorale mammaire.

Nous avons recherché les causes de cette croissance tumorale accrue sous régime HC. Cette diète induit au niveau tumoral une surexpression des ARNm des enzymes impliquées dans la glycolyse (*HK2*, *PFKFB3* et *PFKFB4*) et une sous-expression des bio-catalyseurs du cycle de Krebs (*SHDB* et *IDH3- α*). Contrairement aux cellules non transformées, la plupart des cellules cancéreuses utilisent préférentiellement la voie glycolytique pour produire l'énergie nécessaire à leur besoin sans

faire intervenir le cycle de Krebs, générant ainsi de grandes quantités de lactate et cela même, en présence d'oxygène (Warburg, O. 1956). Cet effet Warburg ou glycolyse aérobie joue un rôle important dans la prolifération tumorale (Buerkle, A. and Weber, W.A. 2008; Menendez, J.A. 2010; Chandra, D. and Singh, K.K. 2011) et pourrait contribuer à la croissance tumorale mammaire accrue des souris placées sous régime HC.

Toujours au niveau tumoral, l'expression génique de *VEGFR2*, impliqué dans l'angiogenèse, est augmentée dans les tumeurs des souris HCT. En accord avec la littérature, une alimentation riche en graisses stimule l'angiogenèse des tumeurs et participe ainsi au développement tumoral (Gu, J.W. et al. 2011; Kim, E.J. et al. 2011).

Les PPAR- α régulent le métabolisme des lipides et sont exprimés dans les cellules MCF-7 (Suchanek, K.M. et al. 2002). En plus de l'activation des gènes régulant le catabolisme des acides gras, les PPAR- α modulent également l'expression de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire (Peters, J.M. et al. 1998). Des études *in vitro* montrent que des agonistes des PPAR- α présentent des effets anti-prolifératifs sur différentes cellules cancéreuses mammaires (Avis, I. et al. 2001; Bocca, C. et al. 2008). Dans notre modèle, l'expression génique des PPAR- α est diminuée dans les tumeurs des souris HCT suggérant qu'une sous-expression des PPAR- α pourrait participer à l'augmentation de la prolifération tumorale mammaire en réponse au régime HC.

L'adiponectine exerce une activité anti-proliférative et apoptotique sur de nombreuses lignées cancéreuses mammaires dont les cellules MCF-7 (Jarde, T. et al. 2009; Jarde, T. et al. 2011). Notre étude montre que le taux plasmatique d'adiponectine n'est pas modifié par le régime HC et/ou par le développement tumoral. Toutefois, l'expression génique d'un de ses récepteurs, *AdipoR1*, est réduite dans les tumeurs des souris soumises au régime HC. Cela suggère que la prolifération des tumeurs pourrait être stimulée *via* une moindre sensibilité à l'adiponectine.

Une diminution des capacités anti-oxydantes de la cellule peut induire un stress oxydant aboutissant à l'apoptose cellulaire (Finkel, T. and Holbrook, N.J. 2000). Le stress oxydant joue également un rôle dans l'initiation, la progression et la « malignité » de nombreux cancers (Grek, C.L. and Tew, K.D. 2010). La superoxyde dismutase à manganèse (MnSOD ou SOD-2) est une enzyme mitochondriale qui catalyse la dismutation des anions superoxyde ($O_2^{\circ-}$) en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en oxygène (Mates, J.M. 2000). Le peroxyde d'hydrogène est ensuite transformé en eau et oxygène moléculaire par différentes enzymes dont les glutathion peroxydases 1 et 2 (GPX-1 et 2) (Mates, J.M. 2000). Une diminution de l'expression génique de *SOD-2* et *GPX-2* et une augmentation de *GPX-1* sont observées dans les tumeurs des souris soumises au régime HC. Un faible taux de SOD-2 stimule la prolifération tumorale de cellules cancéreuses non métastatiques telles que les cellules MCF-7 (Kattan, Z. et al. 2008). De plus, une déficience de GPX-2 induite par siARN accroît la

sensibilité des cellules MCF-7 au stress oxydant provoquant la mort cellulaire (Yan, W. and Chen, X. 2006) et la GPX-1 inhibe l'apoptose de différentes lignées cancéreuses mammaires (Gouaze, V. et al. 2002). Par conséquent, la régulation des gènes impliqués dans le stress oxydant sous régime HC pourrait également participer au développement accru des tumeurs mammaires.

Chez des souris en surpoids suite à un régime riche en lipides, il a été rapporté une augmentation de l'expression tumorale de protéines impliquées dans la prolifération et la survie (Kim, E.J. et al. 2011; Park, H. et al. 2011). Notre étude démontre qu'un régime HC, sans gain de poids corporel, induit également une sur-expression tumorale d'une protéine impliquée dans la prolifération, le Ki67 et une sous-expression de la protéine apoptotique, la caspase 3 clivée.

Les œstrogènes participent à la tumorigenèse mammaire *via* l'activation de leurs récepteurs. Toutefois, l'action des deux RE (α et β) est antagoniste. En effet, le RE- α stimule la prolifération alors que le RE- β induit l'apoptose (Acconcia, F. et al. 2005; Hodges-Gallagher, L. et al. 2008). Par ailleurs, le ratio RE- α /RE- β est plus important dans les tumeurs mammaires invasives que dans le tissu sain (Roger, P. et al. 2001). Dans notre étude, l'expression tumorale de RE- β est réduite sous régime HC alors que celle de RE- α n'est pas modulée. Le ratio RE- α /RE- β est donc augmenté dans les tumeurs des souris HCT suggérant que le régime HC stimule la prolifération tumorale mammaire en inhibant l'expression des RE- β .

Les récepteurs de la progestérone sont également réduits dans les tumeurs des souris HCT. Des effets opposés, stimulateurs et inhibiteurs de la progestérone sur la prolifération cellulaire ont été décrits dans des cellules cancéreuses mammaires en culture et dans des modèles animaux (van der Burg, B. et al. 1992; Lin, V.C. et al. 2001; Conneely, O.M. et al. 2003). La prolifération des cellules tumorales mammaires utilisées dans notre étude est inhibée par la progestérone *via* la voie de signalisation PI3K/Akt (Alkhalaf, M. et al. 2002). Le régime HC contribue également au développement tumoral mammaire en réduisant l'expression des récepteurs de la progestérone. Ces résultats démontrent qu'un régime HC module l'expression génique et protéique des tumeurs mammaires ce qui favorise leur développement.

Dans cette étude, nous avons également déterminé les effets du régime HC associé ou non à la tumeur, sur le nombre et la fonctionnalité des cellules NK. Ces dernières, jouent un rôle important dans la réponse anti-tumorale de l'hôte vis-à-vis de cellules cancéreuses mammaires (Dewan, M.Z. et al. 2007). Des études sur différents modèles murins ont montré qu'une alimentation riche en lipides, favorisant la prise de poids, provoque une diminution du nombre et de la cytotoxicité des cellules NK (Smith, A.G. et al. 2007; Nave, H. et al. 2008; Lautenbach, A. et al. 2009). De façon similaire, nous avons démontré qu'un régime HC, sans prise de poids, provoque une réduction du nombre et de la cytotoxicité des cellules NK spléniques.

La présence de tumeur mammaire stimule la cytotoxicité des cellules NK indépendamment du régime. Toutefois, les souris HCT présentent une diminution significative de l'activité lytique des cellules NK comparativement aux souris SCT. Cela pourrait représenter un mécanisme additionnel reliant le régime HC avec le développement tumoral mammaire accru. L'expression génique tumorale de *Fas* étant inhibée, les tumeurs des souris HCT pourraient être moins sensibles à la cytotoxicité des cellules NK médiée par Fas-L que les tumeurs des souris NCT.

Le GM-CSF, produit par différents types cellulaires dont les macrophages, les LT, les cellules endothéliales et les cellules NK (Cousins, D.J. et al. 1994; Nimer, S.D. and Uchida, H. 1995; Zhang, A.L. et al. 2007) stimule indirectement l'activité cytotoxique des cellules NK (van den Bosch, G. et al. 1995; Kim, K.Y. et al. 2001). Dans notre étude, la concentration plasmatique de GM-CSF est abaissée chez les souris HC et la présence de tumeur augmente le taux de cette cytokine uniquement dans les souris NCT. La diminution de la cytotoxicité observée pourrait ainsi être due à la réduction de la teneur circulante en GM-CSF.

Il est intéressant de noter que le phénotype altéré des cellules NK de rats rendus obèses en réponse au régime hypercalorique tend vers un phénotype normal lorsque ces cellules sont transférées chez des rats de poids normal (Lautenbach, A. et al. 2009). Ces données suggèrent l'implication de facteurs sécrétés spécifiquement en situation d'obésité intervenant dans l'inhibition des cellules NK. Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer ces facteurs produits par la tumeur et/ou les cellules environnantes impliqués dans la réduction de l'activité des cellules NK sous régime HC.

En conclusion, dans ce modèle expérimental, un régime hypercalorique, sans induire de surpoids, stimule la prolifération tumorale mammaire *via* la sur-expression de protéines impliquées dans la prolifération et la sous-expression de protéines pro-apoptotiques. Cette augmentation de la croissance tumorale est également due à l'inhibition de l'expression de récepteurs hormonaux ainsi qu'à la modulation de la régulation de différents gènes contrôlant plusieurs fonctions cellulaires (angiogenèse, stress oxydant, glycolyse, cycle de Krebs...) au niveau tumoral. Cette diète hypercalorique réduit également le nombre et l'activité cytotoxique des cellules NK et contribue ainsi au développement tumoral. Un régime hypercalorique est donc capable d'induire la sécrétion de facteurs susceptibles de stimuler la croissance tumorale et d'inhiber la réponse immune anti-tumorale et cela sans pour autant provoquer de prise de poids.

Parallèlement à cette étude *in vivo*, nous avons souhaité approfondir, *in vitro*, l'effet de certains facteurs sécrétés en situation de cancer sur la fonctionnalité des cellules NK. Les élévations du taux circulant d'IGF-1, des œstrogènes et de certaines adipokines, ont été proposées pour expliquer l'association entre obésité, risque de cancer mammaire et immunodéficience (Calle, E.E. and Kaaks,

R. 2004; Kaaks, R. et al. 2005; Pierdominici, M. et al. 2010; Jarde, T. et al. 2011; Wrann, C.D. et al. 2012). Comme montré *in vivo*, l'expression d'IGF-1 au niveau tumoral n'est pas modulée par le régime HC. Toutes les souris ont reçu un implant délivrant des œstrogènes nécessaires pour la prolifération des cellules MCF-7. Ainsi, ces deux paramètres ne sont probablement pas impliqués dans la diminution de la cytotoxicité des cellules NK. Même si dans notre modèle animal la leptinémie n'est pas modifiée par le régime HC, le micro-environnement adipocytaire excédentaire localisé au niveau mammaire, peut sécréter une quantité accrue de leptine susceptible d'agir à la fois sur les cellules tumorales et sur les cellules immunes présentes *in situ*. En effet, il est bien établi qu'une hyperleptinémie est positivement corrélée à un risque élevé de développer un cancer du sein (Vondra, L. and Rose, D.P. 2007; Jarde, T. et al. 2011) et cette adipokine est capable de moduler la réponse immune innée et adaptative (Matarese, G. et al. 2005; Conde, J. et al. 2010). Notre choix s'est donc porté sur cette adipokine majeure dont les récepteurs sont exprimés par différentes cellules immunitaires telles que les cellules NK (Zhao, Y. et al. 2003; Wrann, C.D. et al. 2012). De plus, les données existantes sur les souris Ob/Ob (Chandra, R.K. 1980; Kanda, T. et al. 2004) ou db/db (Tian, Z. et al. 2002) rapportent une réduction du nombre et de la cytotoxicité des cellules NK, suggérant que la leptine est nécessaire au développement et à l'activation des cellules NK.

Partant de ces données, nous avons déterminé *in vitro* l'impact de la leptine, à une dose retrouvée en situation d'obésité, sur l'activité des cellules NK vis-à-vis de différentes lignées cancéreuses mammaires. Pour cela nous avons utilisé une lignée de cellules NK dépendantes de l'IL-2, les cellules NK-92. De plus, nous avons caractérisé les différents acteurs de la cytotoxicité des cellules NK modulés par la leptine en excès.

En accord avec la littérature nous avons confirmé que les cellules NK-92 expriment les récepteurs de la leptine (Zhao, Y. et al. 2003). Nous avons également établi, pour la première fois, que la leptine stimule de façon dose dépendante l'activité mitochondriale des cellules NK-92. Cette activité est impliquée dans la capacité cytotoxique des cellules NK (Abarca-Rojano, E. et al. 2009). Conformément à la littérature, nous avons démontré que de fortes concentrations de leptine stimulent la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis de la lignée K562 issue d'une érythroleucémie humaine (Zhao, Y. et al. 2003; Wrann, C.D. et al. 2012). Ces données suggèrent que la leptine pourrait activer la cytotoxicité des cellules NK en stimulant leur activité mitochondriale et ainsi participer à la protection anti-tumorale. Toutefois, l'obésité connue pour être associée à une hyperleptinémie chronique (Maffei, M. et al. 1995), induit une diminution de l'activité des cellules NK (Scanga, C.B. et al. 1998; Lynch, L.A. et al. 2009; O'Shea, D. et al. 2010). Par conséquent, l'hypothèse selon laquelle les cellules immunitaires pourraient devenir résistantes à la leptine a été émise pour expliquer l'immunodéficience lors de l'obésité (Karlsson, E.A. and Beck, M.A. 2010). Plusieurs études réalisées sur les cellules NK viennent étayer cette hypothèse. En effet, des cellules NK de volontaires sains

cultivées en présence de fortes concentrations de leptine durant plus de quatre jours présentent une moindre activité lytique et sécrétoire (IFN- γ) (Wrann, C.D. et al. 2012). De plus, l'injection de leptine à des rats rendus obèses en réponse à un régime hypercalorique et à des rats de poids normal, provoque une faible activation des cellules NK (quatre fois inférieure) dans le groupe obèse comparativement au groupe témoin (Nave, H. et al. 2008). Cet effet serait en partie dû à une moindre phosphorylation (donc stimulation) de JAK2 par la leptine, dans les cellules NK des rats obèses (Nave, H. et al. 2008).

Les cellules K562 sont classiquement utilisées pour évaluer la cytotoxicité des cellules NK humaines. Nous avons exploré de façon originale l'activité lytique des cellules NK-92 vis-à-vis de deux lignées tumorales mammaires, les cellules MDA-MB-231 (invasives ; RE⁻) et les cellules MCF-7 (non-invasives ; RE⁺). La leptine à concentration élevée, stimule significativement l'activité cytolytique des cellules NK-92 vis-à-vis des cellules MDA-MB-231. En revanche, les cellules NK-92 ont une cytotoxicité significativement réduite vis-à-vis des cellules MCF-7 suite à leur imprégnation avec les concentrations élevées de leptine. Ces résultats démontrent, pour la première fois, que la leptine module différemment l'activité cytotoxique des cellules NK selon les cellules cibles.

Par la suite, nous avons cherché à identifier les effecteurs de la cytotoxicité des cellules NK modulés par la leptine afin de comprendre les différences d'activité cytotoxique selon les cellules cibles. Une étude sur les cellules YT, lignée humaine de NK indépendantes de l'IL-2, montre que la leptine stimule l'expression génique de la perforine et de l'IL-2 (Zhao, Y. et al. 2003). Par ailleurs, le traitement par la leptine de cellules NK isolées à partir de sang de volontaires sains accroît l'expression de TRAIL ainsi que la sécrétion et la production intracellulaire d'IFN- γ (Wrann, C.D. et al. 2012). En accord avec cette étude, nous avons montré que la leptine, à forte concentrations, stimule l'expression de TRAIL et la production intracellulaire d'IFN- γ et inhibe l'expression de la perforine dans les cellules NK-92. De plus, quelle que soit la concentration utilisée, la leptine ne module pas l'expression protéique du granzyme B et de Fas-L dans les cellules NK-92. Puisque les cellules MDA-MB-231 sont sensibles à l'apoptose induite par TRAIL (Rahman, M. et al. 2009; Jang, J.Y. et al. 2010) et résistantes à celle provoquée par Fas-L (Yu, W. et al. 1999; Ruiz-Ruiz, C. et al. 2000), l'augmentation d'expression de TRAIL en réponse à la leptine pourrait être un des mécanismes impliqués dans la stimulation de la cytotoxicité des cellules NK vis-à-vis de ces cellules tumorales. L'IFN- γ , produit par les cellules NK, stimule leur activité cytotoxique (Strowig, T. et al. 2008; Critchley-Thorne, R.J. et al. 2009) mais, peut également inhiber la prolifération, l'angiogenèse et l'activité métabolique tumorale (Street, S.E. et al. 2001; Ikeda, H. et al. 2002). La production d'IFN- γ par les cellules NK est plus importante en présence de leptine à forte concentration ce qui pourrait également contribuer à la stimulation de la cytotoxicité des cellules NK-92 vis-à-vis des cellules MDA-MB-231.

Les cellules MCF-7 résistent à l'apoptose induite par Fas-L et TRAIL (Yu, W. et al. 1999; Danforth, D.N. and Zhu, Y. 2005; Rahman, M. et al. 2009; Jang, J.Y. et al. 2010). Cela suggère que parmi les effecteurs de la cytotoxicité des cellules NK, seuls la perforine et les granzymes participent à la lyse des cellules MCF-7. La réduction de l'expression de la perforine suite à l'imprégnation des cellules NK-92 avec de fortes concentrations de leptine pourrait expliquer la moindre cytotoxicité des NK vis-à-vis des cellules MCF-7. Les cellules K562, comme les cellules MCF-7, sont résistantes à l'apoptose médiée par Fas-L et TRAIL (Kim, M.J. et al. 2009; Bhattacharya, K. et al. 2010). Cependant la cytotoxicité des NK-92 vis-à-vis de ces cellules est augmentée par les fortes concentrations de leptine. Par conséquent, cette adipokine pourrait également moduler d'autres mécanismes impliqués dans la fonction des cellules NK, tels que les récepteurs activateurs NKp30, NKp46 et NKG2D. En effet, les cellules K562 sont davantage sensibles à la cytotoxicité des cellules NK médiée par NKp30 et NKp46 que les cellules MCF-7 (Mamessier, E. et al. 2011).

En conclusion de cette seconde étude, la leptine stimule l'activité métabolique des cellules NK-92 de façon dose-dépendante. De plus, elle module différemment la cytotoxicité des NK selon les cibles cellulaires utilisées. L'augmentation de l'expression de TRAIL et de l'IFN- γ et la diminution de l'expression de perforine dans les cellules NK-92 en présence de fortes concentrations de leptine pourraient expliquer cet effet sur l'activité lytique des cellules NK. Aussi, l'hyperleptinémie associée à l'obésité ainsi que le micro-environnement adipocytaire mammaire excédentaire capable de sécréter la leptine pourrait favoriser le développement tumoral mammaire et moduler les cellules immunocompétentes présentes *in situ*. Ces données *in vitro* contribuent à mieux comprendre les effets de la leptine à concentration élevée, similaire à celle retrouvée au niveau mammaire, sur la réponse cytotoxique des cellules NK.

Au niveau du micro-environnement tumoral mammaire, d'autres mécanismes sont susceptibles de moduler l'activité anti-tumorale des cellules NK comme la disponibilité de biomolécules (AA, AGPI...). En situation de cancer mammaire, la consommation accrue d'arginine par l'arginase I des MSDC (Serafini, P. et al. 2006; Rodriguez, P.C. and Ochoa, A.C. 2008) et par le tissu tumoral (Singh, R. et al. 2000) est à l'origine d'une déplétion locale voire systémique en arginine (Vissers, Y.L. et al. 2005). Afin de caractériser les altérations fonctionnelles des cellules NK en lien avec les modifications du micro-environnement tumoral, nous avons déterminé l'impact d'une déplétion en arginine sur les fonctions des cellules NK.

La déplétion en arginine induit une inhibition de la prolifération et de l'activation des lymphocytes T (Rodriguez, P.C. and Ochoa, A.C. 2008) mais, l'effet d'une telle déplétion sur les cellules NK a été peu étudié. Conformément à la littérature (Oberlies, J. et al. 2009) nous avons montré que de faibles concentrations d'arginine inhibent la prolifération des cellules NK. Toutefois, contrairement aux LT (Rodriguez, P.C. et al. 2004; Rodriguez, P.C. et al. 2007), le cycle cellulaire des

cellules NK-92 n'est pas bloqué en phase G0-G1 lors d'une déplétion en cet acide aminé. Dans nos conditions expérimentales, l'absence d'arginine réduit la viabilité des cellules NK-92. A l'inverse, une étude a démontré qu'une déplétion totale en cet acide aminé n'altère pas la viabilité des cellules NK humaines circulantes (Oberlies, J. et al. 2009). Cette différence pourrait être due au fait que la lignée NK-92 prolifère plus rapidement que les cellules NK humaines circulantes et nécessite par conséquent davantage d'arginine afin de générer des polyamines essentielles à leur prolifération. En accord avec différentes équipes (Xiao, L. et al. 1995; Furuke, K. et al. 1999), nous avons également démontré que la cytotoxicité des cellules NK-92 et des cellules NK humaines circulantes est inhibée en présence de faibles concentrations d'arginine. A l'inverse, selon Oberlies et al. (2009), l'activité cytotoxique des cellules NK n'est pas dépendante de la concentration en cet acide aminé. Les différences constatées dans les conditions expérimentales et les méthodes utilisées pour mesurer l'activité cytotoxique des NK pourraient expliquer ces résultats contradictoires. Dans nos conditions expérimentales, la déplétion en arginine réduit la prolifération et la cytotoxicité des cellules NK.

Nous avons cherché à identifier les mécanismes par lesquels une déplétion en arginine altère l'activité des cellules NK. Le NO° issu du métabolisme de l'arginine (Wu, G. and Morris, S.M., Jr. 1998) stimule l'activité lytique des cellules NK (Jyothi, M.D. and Khar, A. 1999) et l'inhibition des NOS réduit la cytotoxicité des cellules de façon dose dépendante (Xiao, L. et al. 1995; Furuke, K. et al. 1999). Le NO° participe donc activement à la régulation du fonctionnement des cellules NK. Nous avons exploré l'impact d'une déplétion en arginine sur l'expression génique des transporteurs et des enzymes impliqués dans le métabolisme de cet acide aminé. Même si les ARNm de *Cat 1*, *Cat 2b*, *eNOS*, *arginase 1* et de *ODC* tendent à augmenter en présence de faibles concentrations d'arginine, les différences observées ne sont pas significatives. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour identifier la voie de dégradation préférentielle de l'arginine dans les cellules NK lors d'une déplétion de cet acide aminé.

De faibles concentrations en arginine induisent une anergie des lymphocytes T *via* une inhibition de l'expression de la protéine signal ζ du TCR (Rodriguez, P.C. et al. 2002; Rodriguez, P.C. et al. 2004; Zea, A.H. et al. 2004). Dans de nombreux cancers, il est décrit une sous-expression de la chaîne ζ à la surface des lymphocytes T et des cellules NK (Baniyash, M. 2004). Néanmoins, aucune étude à notre connaissance ne montre que dans les cellules NK cette moindre expression est due à la déplétion en arginine. Le peptide ζ est présent dans les récepteurs activateurs NKp30 et NKp46 des cellules NK où il joue un rôle important dans la transduction du signal (Moretta, A. et al. 2001). Notre étude met en évidence pour la première fois qu'une déplétion en arginine inhibe l'expression de la chaîne ζ et des récepteurs NKp46 et NKp30 dans les cellules NK. De plus, nous avons aussi démontré que la production intracellulaire d'IFN- γ dans les cellules NK est diminuée en présence de faibles concentrations d'Arg. Cette cytokine stimule non seulement la cytotoxicité des cellules NK (Strowig,

T. et al. 2008; Critchley-Thorne, R.J. et al. 2009) mais, elle exerce également une activité anti-tumorale *via* notamment l'inhibition de la prolifération des tumeurs (Street, S.E. et al. 2001; Ikeda, H. et al. 2002). Ces données indiquent qu'une déplétion en arginine inhibe l'activité cytotoxique des cellules NK par une diminution de l'expression de récepteurs activateurs et de protéines « signal » ainsi que par une réduction de leur capacité sécrétoire.

En conclusion, une déplétion en arginine, comme observée en situation de cancer mammaire, inhibe la prolifération et l'activité cytotoxique des cellules NK. L'effet sur la cytotoxicité pourrait être dû à une diminution de la reconnaissance des cellules cibles par les récepteurs activateurs NKp30 et NKp46, à une moindre transmission du signal activateur par la chaîne ζ et à une faible production d'IFN- γ . Ces données, *in vitro*, contribuent à mieux comprendre les effets de faibles concentrations d'arginine comme celles retrouvées au niveau du micro-environnement tumoral mammaire, sur la réponse anti-tumorale des cellules NK.

Partie IV Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les cellules NK sont des acteurs majeurs de la vigilance anti-tumorale. Certaines cellules cancéreuses échappent à cette immunosurveillance. En effet, les tumeurs ont mis en place différents mécanismes d'échappement empêchant la phase d'élimination et favorisant le développement des cellules néoplasiques. Une alimentation hypercalorique induisant le surpoids voire l'obésité est positivement corrélée au risque de développer un cancer du sein. Les cellules NK sont modulées par des facteurs nutritionnels et métaboliques et une réduction de leur activité favorise le développement tumoral mammaire. L'objectif de ce travail a été de caractériser l'activité fonctionnelle et métabolique des cellules NK en réponse à des stress nutritionnels retrouvés dans le micro-environnement tumoral mammaire.

Ces travaux ont montré qu'un régime hypercalorique, sans induire de surpoids, stimule la prolifération tumorale mammaire et réduit le nombre ainsi que la cytotoxicité des cellules NK. La présence d'un cancer mammaire stimule l'activité lytique des cellules NK ; toutefois chez les souris soumises au régime hypercalorique la cytotoxicité de ces cellules reste inférieure à celle des cellules NK des souris témoins recevant un régime normo-calorique. Il serait intéressant d'identifier quelles sont les molécules effectrices de la cytotoxicité des cellules NK modulées par le régime et/ou la tumeur *via* l'étude de leurs expressions protéiques. La technique d'immunohistochimie par fluorescence nous permettrait de caractériser l'infiltration des cellules NK au niveau tumoral et d'évaluer l'impact du régime nutritionnel sur cette infiltration. De plus, l'utilisation de souris répondant à un régime hypercalorique par un gain de poids et développant d'un cancer mammaire, suite à l'injection de cellules tumorales mammaires murines, permettrait d'évaluer de façon complémentaire l'effet des facteurs sécrétés en situation d'obésité sur les fonctions des cellules NK.

Au niveau mammaire, des quantités accrues de leptine peuvent être sécrétées par le micro-environnement adipocytaire et ainsi, favoriser le développement tumoral en modulant la réponse immunitaire. Nous avons établi que la leptine à forte concentration est capable de stimuler ou d'inhiber la cytotoxicité des cellules NK selon le type de cellules cancéreuses mammaires ciblées. Ces effets opposés peuvent s'expliquer par l'augmentation de l'expression de TRAIL et de l'IFN- γ et par la diminution de l'expression de la perforine dans les cellules NK en présence de concentrations supra-physiologiques de leptine. Etudier l'expression de récepteurs activateurs ou inhibiteurs exprimés à la surface des cellules NK et identifier les voies de signalisation mises en jeu nous permettrait de préciser les mécanismes moléculaires par lesquels la leptine module l'activité des cellules NK. Ces approches complémentaires devraient contribuer à terme d'établir si la sécrétion leptinique supra-physiologique associée à l'obésité est un facteur potentiel de réduction de la vigilance anti-tumorale et par conséquent un facteur de risque accru de cancérogenèse mammaire.

En situation de cancer mammaire, une déplétion en arginine au niveau du micro-environnement local voire au niveau systémique est fréquemment retrouvée du fait d'une consommation accrue de cet acide aminé par les cellules MSDC et par le tissu tumoral. Nos travaux montrent qu'une telle déplétion inhibe la prolifération et la cytotoxicité des cellules NK. La réduction de l'expression des récepteurs activateurs NKp30 et NKp46, la moindre transmission du signal activateur par la chaîne ζ et la faible production d'IFN- γ , consécutives à la déplétion en arginine, pourraient contribuer à l'inhibition de la cytotoxicité des cellules NK. La caractérisation des voies de signalisation de l'arginine intervenant dans l'expression des récepteurs NKp30 et NKp46 et de la chaîne ζ , permettrait d'élucider les mécanismes de la moindre cytotoxicité des cellules NK. De plus, l'exploration des voies de signalisation mTOR et GCN2, impliquées dans la régulation du métabolisme protéique, et des activités enzymatiques régulant le métabolisme de l'arginine permettraient d'identifier les voies de dégradation préférentielles de cet acide aminé dans les cellules NK en réponse à une déplétion.

Nous avons ainsi montré qu'un régime hypercalorique est capable de stimuler la prolifération tumorale mammaire notamment en inhibant l'activité cytotoxique des cellules NK. De plus, des modifications du micro-environnement tumoral telles que l'enrichissement en leptine et la déplétion en arginine influencent également la réponse anti-tumorale des cellules NK. Cette modulation de l'activité des cellules NK passe notamment par une modification des capacités sécrétoires ainsi que de l'expression des effecteurs de la cytotoxicité, des récepteurs activateurs et des molécules transmettant le signal stimulateur. Ces travaux contribuent à mieux comprendre les effets du micro-environnement sur l'activité anti-tumorale des cellules NK et sur le développement tumoral.

Partie V Références bibliographiques

Références bibliographiques

-A-

- Abarca-Rojano, E., Muniz-Hernandez, S., Moreno-Altamirano, M. M., Mondragon-Flores, R., Enriquez-Rincon, F. and Sanchez-Garcia, F. J. (2009). "Re-organization of mitochondria at the NK cell immune synapse." Immunol Lett **122**(1): 18-25.
- Abbas, A. K., Murphy, K. M. and Sher, A. (1996). "Functional diversity of helper T lymphocytes." Nature **383**(6603): 787-93.
- Abdulghani, J. and El-Deiry, W. S. (2010). "TRAIL receptor signaling and therapeutics." Expert Opin Ther Targets **14**(10): 1091-108.
- Acconcia, F., Totta, P., Ogawa, S., Cardillo, I., Inoue, S., Leone, S., Trentalance, A., Muramatsu, M. and Marino, M. (2005). "Survival versus apoptotic 17beta-estradiol effect: role of ER alpha and ER beta activated non-genomic signaling." J Cell Physiol **203**(1): 193-201.
- Adegboyega, P. A. and Ololade, O. (2004). "Immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in normal kidneys." Appl Immunohistochem Mol Morphol **12**(1): 71-4.
- Agaugue, S., Marcenaro, E., Ferranti, B., Moretta, L. and Moretta, A. (2008). "Human natural killer cells exposed to IL-2, IL-12, IL-18, or IL-4 differently modulate priming of naive T cells by monocyte-derived dendritic cells." Blood **112**(5): 1776-83.
- Agrawal, S., Gollapudi, S., Su, H. and Gupta, S. (2011). "Leptin activates human B cells to secrete TNF-alpha, IL-6, and IL-10 via JAK2/STAT3 and p38MAPK/ERK1/2 signaling pathway." J Clin Immunol **31**(3): 472-8.
- Ahima, R. S. and Flier, J. S. (2000). "Leptin." Annu Rev Physiol **62**: 413-37.
- Ahima, R. S. and Osei, S. Y. (2004). "Leptin signaling." Physiol Behav **81**(2): 223-41.
- Ahlenstiell, G., Martin, M. P., Gao, X., Carrington, M. and Rehermann, B. (2008). "Distinct KIR/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses." J Clin Invest **118**(3): 1017-26.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. and Weissman, I. L. (2000). "A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages." Nature **404**(6774): 193-7.
- Alas, S., Emmanouilides, C. and Bonavida, B. (2001). "Inhibition of interleukin 10 by rituximab results in down-regulation of bcl-2 and sensitization of B-cell non-Hodgkin's lymphoma to apoptosis." Clin Cancer Res **7**(3): 709-23.
- Algeciras-Schimmich, A. and Peter, M. E. (2003). "Actin dependent CD95 internalization is specific for Type I cells." FEBS Lett **546**(2-3): 185-8.
- Alkhalaf, M., El-Mowafy, A. and Karam, S. (2002). "Growth inhibition of MCF-7 human breast cancer cells by progesterone is associated with cell differentiation and phosphorylation of Akt protein." Eur J Cancer Prev **11**(5): 481-8.
- Allavena, P., Bianchi, G., Zhou, D., van Damme, J., Jilek, P., Sozzani, S. and Mantovani, A. (1994). "Induction of natural killer cell migration by monocyte chemotactic protein-1, -2 and -3." Eur J Immunol **24**(12): 3233-6.
- Allen, N. E., Appleby, P. N., Kaaks, R., Rinaldi, S., Davey, G. K. and Key, T. J. (2003). "Lifestyle determinants of serum insulin-like growth-factor-I (IGF-I), C-peptide and hormone binding protein levels in British women." Cancer Causes Control **14**(1): 65-74.
- Ambs, S., Merriam, W. G., Ogunfusika, M. O., Bennett, W. P., Ishibe, N., Hussain, S. P., Tzeng, E. E., Geller, D. A., Billiar, T. R. and Harris, C. C. (1998). "p53 and vascular endothelial growth factor regulate tumor growth of NOS2-expressing human carcinoma cells." Nat Med **4**(12): 1371-6.
- Anderson, D. M., Kumaki, S., Ahdieh, M., Bertles, J., Tometsko, M., Loomis, A., Giri, J., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. and et al. (1995). "Functional characterization of the human interleukin-15 receptor alpha chain and close linkage of IL15RA and IL2RA genes." J Biol Chem **270**(50): 29862-9.
- Andrade, F., Fellows, E., Jenne, D. E., Rosen, A. and Young, C. S. (2007). "Granzyme H destroys the function of critical adenoviral proteins required for viral DNA replication and granzyme B inhibition." EMBO J **26**(8): 2148-57.
- Andre, P., Spertini, O., Guia, S., Rihet, P., Dignat-George, F., Brailly, H., Sampol, J., Anderson, P. J. and Vivier, E. (2000). "Modification of P-selectin glycoprotein ligand-1 with a natural killer cell-restricted sulfated lactosamine creates an alternate ligand for L-selectin." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(7): 3400-5.
- Andrew, D. P., Chang, M. S., McNinch, J., Wathen, S. T., Rihanek, M., Tseng, J., Spellberg, J. P. and Elias, C. G., 3rd (1998). "STCP-1 (MDC) CC chemokine acts specifically on chronically activated Th2 lymphocytes and is produced by monocytes on stimulation with Th2 cytokines IL-4 and IL-13." J Immunol **161**(9): 5027-38.

- Andzelm, M. M., Chen, X., Krzewski, K., Orange, J. S. and Strominger, J. L. (2007). "Myosin IIA is required for cytolytic granule exocytosis in human NK cells." *J Exp Med* **204**(10): 2285-91.
- Anel, A., Richieri, G. V. and Kleinfeld, A. M. (1993). "Membrane partition of fatty acids and inhibition of T cell function." *Biochemistry* **32**(2): 530-6.
- Anfossi, N., Andre, P., Guia, S., Falk, C. S., Roetynck, S., Stewart, C. A., Bresó, V., Frassati, C., Revirón, D., Middleton, D., Romagne, F., Ugolini, S. and Vivier, E. (2006). "Human NK cell education by inhibitory receptors for MHC class I." *Immunity* **25**(2): 331-42.
- Aptsiauri, N., Cabrera, T., García-Lora, A., López-Nevot, M. A., Ruiz-Cabello, F. and Garrido, F. (2007). "MHC class I antigens and immune surveillance in transformed cells." *Int Rev Cytol* **256**: 139-89.
- Arase, H., Arase, N., Kobayashi, Y., Nishimura, Y., Yonehara, S. and Onoe, K. (1994). "Cytotoxicity of fresh NK1.1+ T cell receptor alpha/beta+ thymocytes against a CD4+8+ thymocyte population associated with intact Fas antigen expression on the target." *J Exp Med* **180**(2): 423-32.
- Arase, H., Saito, T., Phillips, J. H. and Lanier, L. L. (2001). "Cutting edge: the mouse NK cell-associated antigen recognized by DX5 monoclonal antibody is CD49b (alpha 2 integrin, very late antigen-2)." *J Immunol* **167**(3): 1141-4.
- Arend, W. P., Palmer, G. and Gabay, C. (2008). "IL-1, IL-18, and IL-33 families of cytokines." *Immunol Rev* **223**: 20-38.
- Arm, J. P., Nwankwo, C. and Austen, K. F. (1997). "Molecular identification of a novel family of human Ig superfamily members that possess immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs and homology to the mouse gp49B1 inhibitory receptor." *J Immunol* **159**(5): 2342-9.
- Armant, M., Delespesse, G. and Sarfati, M. (1995). "IL-2 and IL-7 but not IL-12 protect natural killer cells from death by apoptosis and up-regulate bcl-2 expression." *Immunology* **85**(2): 331-7.
- Arneson, L. N., Brickshawana, A., Segovis, C. M., Schoon, R. A., Dick, C. J. and Leibson, P. J. (2007). "Cutting edge: syntaxin 11 regulates lymphocyte-mediated secretion and cytotoxicity." *J Immunol* **179**(6): 3397-401.
- Arnon, T. I., Achdout, H., Levi, O., Markel, G., Saleh, N., Katz, G., Gazit, R., Gonen-Gross, T., Hanna, J., Nahari, E., Porgador, A., Honigman, A., Plachter, B., Mevorach, D., Wolf, D. G. and Mandelboim, O. (2005). "Inhibition of the NKp30 activating receptor by pp65 of human cytomegalovirus." *Nat Immunol* **6**(5): 515-23.
- Arnon, T. I., Markel, G. and Mandelboim, O. (2006). "Tumor and viral recognition by natural killer cells receptors." *Semin Cancer Biol* **16**(5): 348-58.
- Arpinati, M., Chirumbolo, G., Urbini, B., Perrone, G., Rondelli, D. and Anasetti, C. (2003). "Role of plasmacytoid dendritic cells in immunity and tolerance after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation." *Transpl Immunol* **11**(3-4): 345-56.
- Arteaga, C. L. (2006). "Inhibition of TGFbeta signaling in cancer therapy." *Curr Opin Genet Dev* **16**(1): 30-7.
- Asai, K., Hiki, N., Mimura, Y., Ogawa, T., Unou, K. and Kaminishi, M. (2001). "Gender differences in cytokine secretion by human peripheral blood mononuclear cells: role of estrogen in modulating LPS-induced cytokine secretion in an ex vivo septic model." *Shock* **16**(5): 340-3.
- Asao, H., Okuyama, C., Kumaki, S., Ishii, N., Tsuchiya, S., Foster, D. and Sugamura, K. (2001). "Cutting edge: the common gamma-chain is an indispensable subunit of the IL-21 receptor complex." *J Immunol* **167**(1): 1-5.
- Atkins, M. B., Lotze, M. T., Dutcher, J. P., Fisher, R. I., Weiss, G., Margolin, K., Abrams, J., Sznol, M., Parkinson, D., Hawkins, M., Paradise, C., Kunkel, L. and Rosenberg, S. A. (1999). "High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993." *J Clin Oncol* **17**(7): 2105-16.
- Aulak, K. S., Miyagi, M., Yan, L., West, K. A., Massillon, D., Crabb, J. W. and Stuehr, D. J. (2001). "Proteomic method identifies proteins nitrated in vivo during inflammatory challenge." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(21): 12056-61.
- Averous, J., Bruhat, A., Jousse, C., Carraro, V., Thiel, G. and Fournoux, P. (2004). "Induction of CHOP expression by amino acid limitation requires both ATF4 expression and ATF2 phosphorylation." *J Biol Chem* **279**(7): 5288-97.
- Avis, I., Hong, S. H., Martinez, A., Moody, T., Choi, Y. H., Trepel, J., Das, R., Jett, M. and Mulshine, J. L. (2001). "Five-lipoxygenase inhibitors can mediate apoptosis in human breast cancer cell lines through complex eicosanoid interactions." *FASEB J* **15**(11): 2007-9.
- Azuma, K., Urano, T., Horie-Inoue, K., Hayashi, S., Sakai, R., Ouchi, Y. and Inoue, S. (2009). "Association of estrogen receptor alpha and histone deacetylase 6 causes rapid deacetylation of tubulin in breast cancer cells." *Cancer Res* **69**(7): 2935-40.

-B-

- Bacon, C. M., McVicar, D. W., Ortaldo, J. R., Rees, R. C., O'Shea, J. J. and Johnston, J. A. (1995a). "Interleukin 12 (IL-12) induces tyrosine phosphorylation of JAK2 and TYK2: differential use of Janus family tyrosine kinases by IL-2 and IL-12." *J Exp Med* **181**(1): 399-404.
- Bacon, C. M., Petricoin, E. F., 3rd, Ortaldo, J. R., Rees, R. C., Lerner, A. C., Johnston, J. A. and O'Shea, J. J. (1995b). "Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16): 7307-11.
- Badman, M. K. and Flier, J. S. (2007). "The adipocyte as an active participant in energy balance and metabolism." *Gastroenterology* **132**(6): 2103-15.
- Balkwill, F. and Mantovani, A. (2001). "Inflammation and cancer: back to Virchow?" *Lancet* **357**(9255): 539-45.
- Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature* **392**(6673): 245-52.
- Banchereau, J., Paczesny, S., Blanco, P., Bennett, L., Pascual, V., Fay, J. and Palucka, A. K. (2003). "Dendritic cells: controllers of the immune system and a new promise for immunotherapy." *Ann N Y Acad Sci* **987**: 180-7.
- Baniyash, M. (2004). "TCR zeta-chain downregulation: curtailing an excessive inflammatory immune response." *Nat Rev Immunol* **4**(9): 675-87.
- Barber, D. F., Faure, M. and Long, E. O. (2004). "LFA-1 contributes an early signal for NK cell cytotoxicity." *J Immunol* **173**(6): 3653-9.
- Barry, M. and Bleackley, R. C. (2002). "Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death." *Nat Rev Immunol* **2**(6): 401-9.
- Barten, R., Torkar, M., Haude, A., Trowsdale, J. and Wilson, M. J. (2001). "Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors." *Trends Immunol* **22**(1): 52-7.
- Barth, R. J., Jr., Mule, J. J., Spiess, P. J. and Rosenberg, S. A. (1991). "Interferon gamma and tumor necrosis factor have a role in tumor regressions mediated by murine CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes." *J Exp Med* **173**(3): 647-58.
- Bashirova, A. A., Martin, M. P., McVicar, D. W. and Carrington, M. (2006). "The killer immunoglobulin-like receptor gene cluster: tuning the genome for defense." *Annu Rev Genomics Hum Genet* **7**: 277-300.
- Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J. H., Lanier, L. L. and Spies, T. (1999). "Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA." *Science* **285**(5428): 727-9.
- Bebo, B. F., Jr., Fyfe-Johnson, A., Adlard, K., Beam, A. G., Vandenbark, A. A. and Offner, H. (2001). "Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains." *J Immunol* **166**(3): 2080-9.
- Belardelli, F. and Ferrantini, M. (2002). "Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity." *Trends Immunol* **23**(4): 201-8.
- Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T., Chance, P. F. and Ochs, H. D. (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." *Nat Genet* **27**(1): 20-1.
- Bessaoud, F., Dures, J. P. and Gerber, M. (2008). "Dietary factors and breast cancer risk: a case control study among a population in Southern France." *Nutr Cancer* **60**(2): 177-87.
- Bettelli, E., Korn, T. and Kuchroo, V. K. (2007). "Th17: the third member of the effector T cell trilogy." *Curr Opin Immunol* **19**(6): 652-7.
- Bhat, R. and Watzl, C. (2007). "Serial killing of tumor cells by human natural killer cells--enhancement by therapeutic antibodies." *PLoS One* **2**(3): e326.
- Bhattacharya, K., Samanta, S. K., Tripathi, R., Mallick, A., Chandra, S., Pal, B. C., Shaha, C. and Mandal, C. (2010). "Apoptotic effects of mahanine on human leukemic cells are mediated through crosstalk between Apo-1/Fas signaling and the Bid protein and via mitochondrial pathways." *Biochem Pharmacol* **79**(3): 361-72.
- Biassoni, R., Falco, M., Cambiaggi, A., Costa, P., Verdiani, S., Pende, D., Conte, R., Di Donato, C., Parham, P. and Moretta, L. (1995). "Amino acid substitutions can influence the natural killer (NK)-mediated recognition of HLA-C molecules. Role of serine-77 and lysine-80 in the target cell protection from lysis mediated by "group 2" or "group 1" NK clones." *J Exp Med* **182**(2): 605-9.
- Biassoni, R., Cantoni, C., Falco, M., Verdiani, S., Bottino, C., Vitale, M., Conte, R., Poggi, A., Moretta, A. and Moretta, L. (1996). "The human leukocyte antigen (HLA)-C-specific "activatory" or "inhibitory" natural killer cell receptors display highly homologous extracellular domains but differ in their transmembrane and intracytoplasmic portions." *J Exp Med* **183**(2): 645-50.
- Biassoni, R. (2009). "Human natural killer receptors, co-receptors, and their ligands." *Curr Protoc Immunol* **Chapter 14**: Unit 14 10.

- Bidlingmaier, M., Auernhammer, C. J., Feldmeier, H. and Strasburger, C. J. (1997). "Effects of growth hormone and insulin-like growth factor I binding to natural killer cells." *Acta Paediatr Suppl* **423**: 80-1.
- Bing, R. J., Miyataka, M., Rich, K. A., Hanson, N., Wang, X., Slosser, H. D. and Shi, S. R. (2001). "Nitric oxide, prostanooids, cyclooxygenase, and angiogenesis in colon and breast cancer." *Clin Cancer Res* **7**(11): 3385-92.
- Bingle, L., Brown, N. J. and Lewis, C. E. (2002). "The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies." *J Pathol* **196**(3): 254-65.
- Binyamin, L., Alpaugh, R. K., Hughes, T. L., Lutz, C. T., Campbell, K. S. and Weiner, L. M. (2008). "Blocking NK cell inhibitory self-recognition promotes antibody-dependent cellular cytotoxicity in a model of anti-lymphoma therapy." *J Immunol* **180**(9): 6392-401.
- Biswas, S. K., Gangi, L., Paul, S., Schioppa, T., Saccani, A., Sironi, M., Bottazzi, B., Doni, A., Vincenzo, B., Pasqualini, F., Vago, L., Nebuloni, M., Mantovani, A. and Sica, A. (2006). "A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation)." *Blood* **107**(5): 2112-22.
- Bjorbaek, C., Uotani, S., da Silva, B. and Flier, J. S. (1997). "Divergent signaling capacities of the long and short isoforms of the leptin receptor." *J Biol Chem* **272**(51): 32686-95.
- Bjornstrom, L., Kilic, E., Norman, M., Parker, M. G. and Sjoberg, M. (2001). "Cross-talk between Stat5b and estrogen receptor-alpha and -beta in mammary epithelial cells." *J Mol Endocrinol* **27**(1): 93-106.
- Bjornstrom, L. and Sjoberg, M. (2004). "Estrogen receptor-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling." *Nucl Recept* **2**(1): 3.
- Blankenstein, T. (2005). "The role of tumor stroma in the interaction between tumor and immune system." *Curr Opin Immunol* **17**(2): 180-6.
- Bloushtain, N., Qimron, U., Bar-Ilan, A., HersHKovitz, O., Gazit, R., Fima, E., Korc, M., Vlodavsky, I., Bovin, N. V. and Porgador, A. (2004). "Membrane-associated heparan sulfate proteoglycans are involved in the recognition of cellular targets by NKp30 and NKp46." *J Immunol* **173**(4): 2392-401.
- Bocca, C., Bozzo, F., Martinasso, G., Canuto, R. A. and Miglietta, A. (2008). "Involvement of PPARalpha in the growth inhibitory effect of arachidonic acid on breast cancer cells." *Br J Nutr* **100**(4): 739-50.
- Bogdan, C. (2001). "Nitric oxide and the immune response." *Nat Immunol* **2**(10): 907-16.
- Bolitho, P., Voskoboinik, I., Trapani, J. A. and Smyth, M. J. (2007). "Apoptosis induced by the lymphocyte effector molecule perforin." *Curr Opin Immunol* **19**(3): 339-47.
- Bonefeld, K. and Moller, S. (2010). "Insulin-like growth factor-I and the liver." *Liver Int* **31**(7): 911-9.
- Borges, L., Hsu, M. L., Fanger, N., Kubin, M. and Cosman, D. (1997). "A family of human lymphoid and myeloid Ig-like receptors, some of which bind to MHC class I molecules." *J Immunol* **159**(11): 5192-6.
- Born, T. L., Thomassen, E., Bird, T. A. and Sims, J. E. (1998). "Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling." *J Biol Chem* **273**(45): 29445-50.
- Bosetti, C., Bertuccio, P., Levi, F., Chatenoud, L., Negri, E. and La Vecchia, C. (2012). "The decline in breast cancer mortality in Europe: an update (to 2009)." *Breast* **21**(1): 77-82.
- Bouaziz, J. D., Yanaba, K., Venturi, G. M., Wang, Y., Tisch, R. M., Poe, J. C. and Tedder, T. F. (2007). "Therapeutic B cell depletion impairs adaptive and autoreactive CD4+ T cell activation in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(52): 20878-83.
- Bouman, A., Schipper, M., Heineman, M. J. and Faas, M. (2004). "17beta-estradiol and progesterone do not influence the production of cytokines from lipopolysaccharide-stimulated monocytes in humans." *Fertil Steril* **82 Suppl 3**: 1212-9.
- Bovenschen, N., de Koning, P. J., Quadir, R., Broekhuizen, R., Damen, J. M., Froelich, C. J., Slijper, M. and Kummer, J. A. (2008). "NK cell protease granzyme M targets alpha-tubulin and disorganizes the microtubule network." *J Immunol* **180**(12): 8184-91.
- Bradley, M., Zeytun, A., Rafi-Janajreh, A., Nagarkatti, P. S. and Nagarkatti, M. (1998). "Role of spontaneous and interleukin-2-induced natural killer cell activity in the cytotoxicity and rejection of Fas+ and Fas-tumor cells." *Blood* **92**(11): 4248-55.
- Brady, J., Hayakawa, Y., Smyth, M. J. and Nutt, S. L. (2004). "IL-21 induces the functional maturation of murine NK cells." *J Immunol* **172**(4): 2048-58.
- Brandacher, G., Perathoner, A., Ladurner, R., Schneeberger, S., Obrist, P., Winkler, C., Werner, E. R., Werner-Felmayer, G., Weiss, H. G., Gobel, G., Margreiter, R., Konigsrainer, A., Fuchs, D. and Amberger, A. (2006). "Prognostic value of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in colorectal cancer: effect on tumor-infiltrating T cells." *Clin Cancer Res* **12**(4): 1144-51.
- Brandt, C. S., Baratin, M., Yi, E. C., Kennedy, J., Gao, Z., Fox, B., Haldeman, B., Ostrander, C. D., Kaifu, T., Chabannon, C., Moretta, A., West, R., Xu, W., Vivier, E. and Levin, S. D. (2009). "The B7 family member B7-H6 is a tumor cell ligand for the activating natural killer cell receptor NKp30 in humans." *J Exp Med* **206**(7): 1495-503.

- Braud, V., Jones, E. Y. and McMichael, A. (1997). "The human major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E binds signal sequence-derived peptides with primary anchor residues at positions 2 and 9." *Eur J Immunol* **27**(5): 1164-9.
- Braun, S., Bitton-Worms, K. and LeRoith, D. (2011). "The link between the metabolic syndrome and cancer." *Int J Biol Sci* **7**(7): 1003-15.
- Brilot, F., Strowig, T., Roberts, S. M., Arrey, F. and Munz, C. (2007). "NK cell survival mediated through the regulatory synapse with human DCs requires IL-15Ralpha." *J Clin Invest* **117**(11): 3316-29.
- Briscoe, C. P., Tadayon, M., Andrews, J. L., Benson, W. G., Chambers, J. K., Eilert, M. M., Ellis, C., Elshourbagy, N. A., Goetz, A. S., Minnick, D. T., Murdock, P. R., Sauls, H. R., Jr., Shabon, U., Spinage, L. D., Strum, J. C., Szekeres, P. G., Tan, K. B., Way, J. M., Ignar, D. M., Wilson, S. and Muir, A. I. (2003). "The orphan G protein-coupled receptor GPR40 is activated by medium and long chain fatty acids." *J Biol Chem* **278**(13): 11303-11.
- Brito, C., Naviliat, M., Tiscornia, A. C., Vuillier, F., Gualco, G., Dighiero, G., Radi, R. and Cayota, A. M. (1999). "Peroxynitrite inhibits T lymphocyte activation and proliferation by promoting impairment of tyrosine phosphorylation and peroxynitrite-driven apoptotic death." *J Immunol* **162**(6): 3356-66.
- Bronte, V., Kasic, T., Gri, G., Gallana, K., Borsellino, G., Marigo, I., Battistini, L., Iafrate, M., Prayer-Galetti, T., Pagano, F. and Viola, A. (2005). "Boosting antitumor responses of T lymphocytes infiltrating human prostate cancers." *J Exp Med* **201**(8): 1257-68.
- Bronte, V. and Zanovello, P. (2005). "Regulation of immune responses by L-arginine metabolism." *Nat Rev Immunol* **5**(8): 641-54.
- Brooks, A. G., Posch, P. E., Scorzelli, C. J., Borrego, F. and Coligan, J. E. (1997). "NKG2A complexed with CD94 defines a novel inhibitory natural killer cell receptor." *J Exp Med* **185**(4): 795-800.
- Brosnan, M. E. and Brosnan, J. T. (2004). "Renal arginine metabolism." *J Nutr* **134**(10 Suppl): 2791S-2795S; discussion 2796S-2797S.
- Brown, D. A. and London, E. (2000). "Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts." *J Biol Chem* **275**(23): 17221-4.
- Brumbaugh, K. M., Binstadt, B. A., Billadeau, D. D., Schoon, R. A., Dick, C. J., Ten, R. M. and Leibson, P. J. (1997). "Functional role for Syk tyrosine kinase in natural killer cell-mediated natural cytotoxicity." *J Exp Med* **186**(12): 1965-74.
- Bruna, A., Darken, R. S., Rojo, F., Ocana, A., Penuelas, S., Arias, A., Paris, R., Tortosa, A., Mora, J., Baselga, J. and Seoane, J. (2007). "High TGFbeta-Smad activity confers poor prognosis in glioma patients and promotes cell proliferation depending on the methylation of the PDGF-B gene." *Cancer Cell* **11**(2): 147-60.
- Bruna, M. J., Luistro, L., Warrier, R. R., Wright, R. B., Hubbard, B. R., Murphy, M., Wolf, S. F. and Gately, M. K. (1993). "Antitumor and antimetastatic activity of interleukin 12 against murine tumors." *J Exp Med* **178**(4): 1223-30.
- Brune, B. (2003). "Nitric oxide: NO apoptosis or turning it ON?" *Cell Death Differ* **10**(8): 864-9.
- Bruno, A., Conus, S., Schmid, I. and Simon, H. U. (2005). "Apoptotic pathways are inhibited by leptin receptor activation in neutrophils." *J Immunol* **174**(12): 8090-6.
- Bryceson, Y. T., March, M. E., Ljunggren, H. G. and Long, E. O. (2006). "Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion." *Blood* **107**(1): 159-66.
- Buerkle, A. and Weber, W. A. (2008). "Imaging of tumor glucose utilization with positron emission tomography." *Cancer Metastasis Rev* **27**(4): 545-54.
- Bui, J. D., Carayannopoulos, L. N., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M. and Schreiber, R. D. (2006). "IFN-dependent down-regulation of the NKG2D ligand H60 on tumors." *J Immunol* **176**(2): 905-13.
- Bullock, A. N. and Fersht, A. R. (2001). "Rescuing the function of mutant p53." *Nat Rev Cancer* **1**(1): 68-76.
- Bulun, S. E., Mahendroo, M. S. and Simpson, E. R. (1994). "Aromatase gene expression in adipose tissue: relationship to breast cancer." *J Steroid Biochem Mol Biol* **49**(4-6): 319-26.
- Bunt, S. K., Yang, L., Sinha, P., Clements, V. K., Leips, J. and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). "Reduced inflammation in the tumor microenvironment delays the accumulation of myeloid-derived suppressor cells and limits tumor progression." *Cancer Res* **67**(20): 10019-26.
- Burgess, S. J., Marusina, A. I., Pathmanathan, I., Borrego, F. and Coligan, J. E. (2006). "IL-21 down-regulates NKG2D/DAP10 expression on human NK and CD8+ T cells." *J Immunol* **176**(3): 1490-7.
- Burnet, F. M. (1970). "The concept of immunological surveillance." *Prog Exp Tumor Res* **13**: 1-27.
- Burshtyn, D. N., Yang, W., Yi, T. and Long, E. O. (1997). "A novel phosphotyrosine motif with a critical amino acid at position -2 for the SH2 domain-mediated activation of the tyrosine phosphatase SHP-1." *J Biol Chem* **272**(20): 13066-72.
- Byrd, A., Hoffmann, S. C., Jarahian, M., Momburg, F. and Watzl, C. (2007). "Expression analysis of the ligands for the Natural Killer cell receptors Nkp30 and Nkp44." *PLoS One* **2**(12): e1339.

- Byrne, P., McGuirk, P., Todryk, S. and Mills, K. H. (2004). "Depletion of NK cells results in disseminating lethal infection with Bordetella pertussis associated with a reduction of antigen-specific Th1 and enhancement of Th2, but not Tr1 cells." Eur J Immunol **34**(9): 2579-88.
- C-
- Cagnano, E., Hershkovitz, O., Zilka, A., Bar-Ilan, A., Golder, A., Sion-Vardy, N., Bogdanov-Berezovsky, A., Mandelboim, O., Benharroch, D. and Porgador, A. (2008). "Expression of ligands to NKp46 in benign and malignant melanocytes." J Invest Dermatol **128**(4): 972-9.
- Caldefie-Chezet, F., Poulin, A., Tridon, A., Sion, B. and Vasson, M. P. (2001). "Leptin: a potential regulator of polymorphonuclear neutrophil bactericidal action?" J Leukoc Biol **69**(3): 414-8.
- Caldefie-Chezet, F., Poulin, A. and Vasson, M. P. (2003). "Leptin regulates functional capacities of polymorphonuclear neutrophils." Free Radic Res **37**(8): 809-14.
- Calder, P. C., Bond, J. A., Harvey, D. J., Gordon, S. and Newsholme, E. A. (1990). "Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis." Biochem J **269**(3): 807-14.
- Calder, P. C., Yaqoob, P., Harvey, D. J., Watts, A. and Newsholme, E. A. (1994). "Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity." Biochem J **300** (Pt 2): 509-18.
- Calder, P. C. (1995). "Fatty acids, dietary lipids and lymphocyte functions." Biochem Soc Trans **23**(2): 302-9.
- Calder, P. C. (2006). "Polyunsaturated fatty acids and inflammation." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **75**(3): 197-202.
- Calder, P. C. (2007). "Immunomodulation by omega-3 fatty acids." Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids **77**(5-6): 327-35.
- Caligiuri, M. A. (2008). "Human natural killer cells." Blood **112**(3): 461-9.
- Calle, E. E. and Kaaks, R. (2004). "Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms." Nat Rev Cancer **4**(8): 579-91.
- Calone, I. and Souchelnytskyi, S. (2012). "Inhibition of TGFbeta signaling and its implications in cancer treatments." Exp Oncol **34**(1): 9-16.
- Campbell, J. J., Qin, S., Unutmaz, D., Soler, D., Murphy, K. E., Hodge, M. R., Wu, L. and Butcher, E. C. (2001). "Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire." J Immunol **166**(11): 6477-82.
- Campbell, K. S., Yusa, S., Kikuchi-Maki, A. and Catina, T. L. (2004). "NKp44 triggers NK cell activation through DAP12 association that is not influenced by a putative cytoplasmic inhibitory sequence." J Immunol **172**(2): 899-906.
- Campbell, K. S. and Purdy, A. K. (2011). "Structure/function of human killer cell immunoglobulin-like receptors: lessons from polymorphisms, evolution, crystal structures and mutations." Immunology **132**(3): 315-25.
- Cantoni, C., Bottino, C., Vitale, M., Pessino, A., Augugliaro, R., Malaspina, A., Parolini, S., Moretta, L., Moretta, A. and Biassoni, R. (1999). "NKp44, a triggering receptor involved in tumor cell lysis by activated human natural killer cells, is a novel member of the immunoglobulin superfamily." J Exp Med **189**(5): 787-96.
- Cao, X., Cai, S. F., Fehniger, T. A., Song, J., Collins, L. I., Piwnica-Worms, D. R. and Ley, T. J. (2007). "Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance." Immunity **27**(4): 635-46.
- Caprioli, F., Sarra, M., Caruso, R., Stolfi, C., Fina, D., Sica, G., MacDonald, T. T., Pallone, F. and Monteleone, G. (2008). "Autocrine regulation of IL-21 production in human T lymphocytes." J Immunol **180**(3): 1800-7.
- Car, B. D., Eng, V. M., Lipman, J. M. and Anderson, T. D. (1999). "The toxicology of interleukin-12: a review." Toxicol Pathol **27**(1): 58-63.
- Carlsson, B., Lindell, K., Gabrielsson, B., Karlsson, C., Bjarnason, R., Westphal, O., Karlsson, U., Sjöström, L. and Carlsson, L. M. (1997). "Obese (ob) gene defects are rare in human obesity." Obes Res **5**(1): 30-5.
- Carosella, E. D., Paul, P., Moreau, P. and Rouas-Freiss, N. (2000). "HLA-G and HLA-E: fundamental and pathophysiological aspects." Immunol Today **21**(11): 532-4.
- Carpen, O., Virtanen, I., Lehto, V. P. and Saksela, E. (1983). "Polarization of NK cell cytoskeleton upon conjugation with sensitive target cells." J Immunol **131**(6): 2695-8.
- Carpenter, C. L., Ross, R. K., Paganini-Hill, A. and Bernstein, L. (2003). "Effect of family history, obesity and exercise on breast cancer risk among postmenopausal women." Int J Cancer **106**(1): 96-102.
- Carr, W. H., Pando, M. J. and Parham, P. (2005). "KIR3DL1 polymorphisms that affect NK cell inhibition by HLA-Bw4 ligand." J Immunol **175**(8): 5222-9.

- Carrington, M. and Martin, M. P. (2006). "The impact of variation at the KIR gene cluster on human disease." Curr Top Microbiol Immunol **298**: 225-57.
- Carrington, P. E., Sandu, C., Wei, Y., Hill, J. M., Morisawa, G., Huang, T., Gavathiotis, E. and Werner, M. H. (2006). "The structure of FADD and its mode of interaction with procaspase-8." Mol Cell **22**(5): 599-610.
- Casetti, R. and Martino, A. (2008). "The plasticity of gamma delta T cells: innate immunity, antigen presentation and new immunotherapy." Cell Mol Immunol **5**(3): 161-70.
- Castriconi, R., Cantoni, C., Della Chiesa, M., Vitale, M., Marcenaro, E., Conte, R., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L. and Moretta, A. (2003). "Transforming growth factor beta 1 inhibits expression of NKp30 and NKG2D receptors: consequences for the NK-mediated killing of dendritic cells." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(7): 4120-5.
- Castriconi, R., Dondero, A., Negri, F., Bellora, F., Nozza, P., Carnemolla, B., Raso, A., Moretta, L., Moretta, A. and Bottino, C. (2007). "Both CD133+ and CD133- medulloblastoma cell lines express ligands for triggering NK receptors and are susceptible to NK-mediated cytotoxicity." Eur J Immunol **37**(11): 3190-6.
- Cazac, B. B. and Roes, J. (2000). "TGF-beta receptor controls B cell responsiveness and induction of IgA in vivo." Immunity **13**(4): 443-51.
- Celis, J. E., Moreira, J. M., Cabezon, T., Gromov, P., Friis, E., Rank, F. and Gromova, I. (2005). "Identification of extracellular and intracellular signaling components of the mammary adipose tissue and its interstitial fluid in high risk breast cancer patients: toward dissecting the molecular circuitry of epithelial-adipocyte stromal cell interactions." Mol Cell Proteomics **4**(4): 492-522.
- Cella, M., Longo, A., Ferrara, G. B., Strominger, J. L. and Colonna, M. (1994). "NK3-specific natural killer cells are selectively inhibited by Bw4-positive HLA alleles with isoleucine 80." J Exp Med **180**(4): 1235-42.
- Cella, M., Dohring, C., Samaridis, J., Dessing, M., Brockhaus, M., Lanzavecchia, A. and Colonna, M. (1997). "A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing." J Exp Med **185**(10): 1743-51.
- Cerwenka, A., Bakker, A. B., McClanahan, T., Wagner, J., Wu, J., Phillips, J. H. and Lanier, L. L. (2000). "Retinoic acid early inducible genes define a ligand family for the activating NKG2D receptor in mice." Immunity **12**(6): 721-7.
- Chambers, S. K., Kacinski, B. M., Ivins, C. M. and Carcangiu, M. L. (1997). "Overexpression of epithelial macrophage colony-stimulating factor (CSF-1) and CSF-1 receptor: a poor prognostic factor in epithelial ovarian cancer, contrasted with a protective effect of stromal CSF-1." Clin Cancer Res **3**(6): 999-1007.
- Champsaur, M. and Lanier, L. L. (2010). "Effect of NKG2D ligand expression on host immune responses." Immunol Rev **235**(1): 267-85.
- Chan, A., Hong, D. L., Atzberger, A., Kollnberger, S., Filer, A. D., Buckley, C. D., McMichael, A., Enver, T. and Bowness, P. (2007). "CD56bright human NK cells differentiate into CD56dim cells: role of contact with peripheral fibroblasts." J Immunol **179**(1): 89-94.
- Chandra, D. and Singh, K. K. (2011). "Genetic insights into OXPHOS defect and its role in cancer." Biochim Biophys Acta **1807**(6): 620-5.
- Chandra, R. K. (1980). "Cell-mediated immunity in genetically obese C57BL/6J ob/ob mice." Am J Clin Nutr **33**(1): 13-6.
- Chang, C., Rodriguez, A., Carretero, M., Lopez-Botet, M., Phillips, J. H. and Lanier, L. L. (1995). "Molecular characterization of human CD94: a type II membrane glycoprotein related to the C-type lectin superfamily." Eur J Immunol **25**(9): 2433-7.
- Chang, C., Dietrich, J., Harpur, A. G., Lindquist, J. A., Haude, A., Loke, Y. W., King, A., Colonna, M., Trowsdale, J. and Wilson, M. J. (1999). "Cutting edge: KAP10, a novel transmembrane adapter protein genetically linked to DAP12 but with unique signaling properties." J Immunol **163**(9): 4651-4.
- Chang, C. I., Liao, J. C. and Kuo, L. (2001). "Macrophage arginase promotes tumor cell growth and suppresses nitric oxide-mediated tumor cytotoxicity." Cancer Res **61**(3): 1100-6.
- Chang, H. L., Gillett, N., Figari, I., Lopez, A. R., Palladino, M. A. and Derynck, R. (1993). "Increased transforming growth factor beta expression inhibits cell proliferation in vitro, yet increases tumorigenicity and tumor growth of Meth A sarcoma cells." Cancer Res **53**(18): 4391-8.
- Chapkin, R. S., Akoh, C. C. and Miller, C. C. (1991). "Influence of dietary n-3 fatty acids on macrophage glycerophospholipid molecular species and peptidoleukotriene synthesis." J Lipid Res **32**(7): 1205-13.
- Charles, J., Di Domizio, J., Salameire, D., Bendriss-Vermare, N., Aspod, C., Muhammad, R., Lefebvre, C., Plumas, J., Leccia, M. T. and Chaperot, L. (2010). "Characterization of circulating dendritic cells in melanoma: role of CCR6 in plasmacytoid dendritic cell recruitment to the tumor." J Invest Dermatol **130**(6): 1646-56.

- Chaux, P., Favre, N., Bonnotte, B., Moutet, M., Martin, M. and Martin, F. (1997). "Tumor-infiltrating dendritic cells are defective in their antigen-presenting function and inducible B7 expression. A role in the immune tolerance to antigenic tumors." *Adv Exp Med Biol* **417**: 525-8.
- Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M. C., Zenteno, E., Chavez, R. and Lascurain, R. (2009). "Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes." *Cell Mol Immunol* **6**(1): 15-25.
- Chen, C., Chang, Y. C., Liu, C. L., Chang, K. J. and Guo, I. C. (2006). "Leptin-induced growth of human ZR-75-1 breast cancer cells is associated with up-regulation of cyclin D1 and c-Myc and down-regulation of tumor suppressor p53 and p21WAF1/CIP1." *Breast Cancer Res Treat* **98**(2): 121-32.
- Chen, C. C., Sun, Y. T., Chen, J. J. and Chang, Y. J. (2001). "Tumor necrosis factor-alpha-induced cyclooxygenase-2 expression via sequential activation of ceramide-dependent mitogen-activated protein kinases, and IkappaB kinase 1/2 in human alveolar epithelial cells." *Mol Pharmacol* **59**(3): 493-500.
- Chen, S., Kawashima, H., Lowe, J. B., Lanier, L. L. and Fukuda, M. (2005). "Suppression of tumor formation in lymph nodes by L-selectin-mediated natural killer cell recruitment." *J Exp Med* **202**(12): 1679-89.
- Chen, W., Liang, X., Peterson, A. J., Munn, D. H. and Blazar, B. R. (2008). "The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation." *J Immunol* **181**(8): 5396-404.
- Chen, X., Allan, D. S., Krzewski, K., Ge, B., Kopcow, H. and Strominger, J. L. (2006). "CD28-stimulated ERK2 phosphorylation is required for polarization of the microtubule organizing center and granules in YTS NK cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(27): 10346-51.
- Chicoine, L. G., Paffett, M. L., Young, T. L. and Nelin, L. D. (2004). "Arginase inhibition increases nitric oxide production in bovine pulmonary arterial endothelial cells." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**(1): L60-8.
- Cho, D., Kim, T. G., Lee, W., Hwang, Y. I., Cho, H. I., Han, H., Kwon, O., Kim, D., Park, H. and Houh, D. (2000a). "Interleukin-18 and the costimulatory molecule B7-1 have a synergistic anti-tumor effect on murine melanoma; implication of combined immunotherapy for poorly immunogenic malignancy." *J Invest Dermatol* **114**(5): 928-34.
- Cho, D., Song, H., Kim, Y. M., Houh, D., Hur, D. Y., Park, H., Yoon, D., Pyun, K. H., Lee, W. J., Kurimoto, M., Kim, Y. B., Kim, Y. S. and Choi, I. (2000b). "Endogenous interleukin-18 modulates immune escape of murine melanoma cells by regulating the expression of Fas ligand and reactive oxygen intermediates." *Cancer Res* **60**(10): 2703-9.
- Chowdhury, D. and Lieberman, J. (2008). "Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death." *Annu Rev Immunol* **26**: 389-420.
- Chtanova, T., Kemp, R. A., Sutherland, A. P., Ronchese, F. and Mackay, C. R. (2001). "Gene microarrays reveal extensive differential gene expression in both CD4(+) and CD8(+) type 1 and type 2 T cells." *J Immunol* **167**(6): 3057-63.
- Chua, H. L., Serov, Y. and Brahmi, Z. (2004). "Regulation of FasL expression in natural killer cells." *Hum Immunol* **65**(4): 317-27.
- Chua, S. C., Jr., Koutras, I. K., Han, L., Liu, S. M., Kay, J., Young, S. J., Chung, W. K. and Leibel, R. L. (1997). "Fine structure of the murine leptin receptor gene: splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts." *Genomics* **45**(2): 264-70.
- Cianchi, F., Cortesini, C., Fantappie, O., Messerini, L., Sardi, I., Lasagna, N., Perna, F., Fabbroni, V., Di Felice, A., Perigli, G., Mazzanti, R. and Masini, E. (2004). "Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer." *Clin Cancer Res* **10**(8): 2694-704.
- Cirillo, D., Rachiglio, A. M., la Montagna, R., Giordano, A. and Normanno, N. (2008). "Leptin signaling in breast cancer: an overview." *J Cell Biochem* **105**(4): 956-64.
- Clark, R. B., Bishop-Bailey, D., Estrada-Hernandez, T., Hla, T., Puddington, L. and Padula, S. J. (2000). "The nuclear receptor PPAR gamma and immunoregulation: PPAR gamma mediates inhibition of helper T cell responses." *J Immunol* **164**(3): 1364-71.
- Claycombe, K., King, L. E. and Fraker, P. J. (2008). "A role for leptin in sustaining lymphopoiesis and myelopoiesis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(6): 2017-21.
- Cleary, M. P., Phillips, F. C., Getzin, S. C., Jacobson, T. L., Jacobson, M. K., Christensen, T. A., Juneja, S. C., Grande, J. P. and Maihle, N. J. (2003). "Genetically obese MMTV-TGF-alpha/Lep(ob)Lep(ob) female mice do not develop mammary tumors." *Breast Cancer Res Treat* **77**(3): 205-15.
- Cleary, M. P., Juneja, S. C., Phillips, F. C., Hu, X., Grande, J. P. and Maihle, N. J. (2004). "Leptin receptor-deficient MMTV-TGF-alpha/Lepr(db)Lepr(db) female mice do not develop oncogene-induced mammary tumors." *Exp Biol Med (Maywood)* **229**(2): 182-93.
- Cleary, M. P. and Grossmann, M. E. (2009). "Minireview: Obesity and breast cancer: the estrogen connection." *Endocrinology* **150**(6): 2537-42.

- Closs, E. I., Boissel, J. P., Habermeier, A. and Rotmann, A. (2006). "Structure and function of cationic amino acid transporters (CATs)." *J Membr Biol* **213**(2): 67-77.
- Cobbs, C. S., Brenman, J. E., Aldape, K. D., Bredt, D. S. and Israel, M. A. (1995). "Expression of nitric oxide synthase in human central nervous system tumors." *Cancer Res* **55**(4): 727-30.
- Cohen, S. B., Crawley, J. B., Kahan, M. C., Feldmann, M. and Foxwell, B. M. (1997). "Interleukin-10 rescues T cells from apoptotic cell death: association with an upregulation of Bcl-2." *Immunology* **92**(1): 1-5.
- Colombo, M. P. and Trinchieri, G. (2002). "Interleukin-12 in anti-tumor immunity and immunotherapy." *Cytokine Growth Factor Rev* **13**(2): 155-68.
- Colonna, M. and Samaridis, J. (1995). "Cloning of immunoglobulin-superfamily members associated with HLA-C and HLA-B recognition by human natural killer cells." *Science* **268**(5209): 405-8.
- Colonna, M., Navarro, F., Bellon, T., Llano, M., Garcia, P., Samaridis, J., Angman, L., Cella, M. and Lopez-Botet, M. (1997). "A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells." *J Exp Med* **186**(11): 1809-18.
- Colonna, M., Samaridis, J., Cella, M., Angman, L., Allen, R. L., O'Callaghan, C. A., Dunbar, R., Ogg, G. S., Cerundolo, V. and Rolink, A. (1998). "Human myelomonocytic cells express an inhibitory receptor for classical and nonclassical MHC class I molecules." *J Immunol* **160**(7): 3096-100.
- Colonna, M., Nakajima, H., Navarro, F. and Lopez-Botet, M. (1999). "A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells." *J Leukoc Biol* **66**(3): 375-81.
- Comes, A., Rosso, O., Orengo, A. M., Di Carlo, E., Sorrentino, C., Meazza, R., Piazza, T., Valzasina, B., Nanni, P., Colombo, M. P. and Ferrini, S. (2006). "CD25+ regulatory T cell depletion augments immunotherapy of micrometastases by an IL-21-secreting cellular vaccine." *J Immunol* **176**(3): 1750-8.
- Conde, J., Scotece, M., Gomez, R., Gomez-Reino, J. J., Lago, F. and Gualillo, O. (2010). "At the crossroad between immunity and metabolism: focus on leptin." *Expert Rev Clin Immunol* **6**(5): 801-8.
- Cone, J. C., Lu, Y., Trevillyan, J. M., Bjorndahl, J. M. and Phillips, C. A. (1993). "Association of the p56lck protein tyrosine kinase with the Fc gamma RIIIA/CD16 complex in human natural killer cells." *Eur J Immunol* **23**(10): 2488-97.
- Conneely, O. M., Jericevic, B. M. and Lydon, J. P. (2003). "Progesterone receptors in mammary gland development and tumorigenesis." *J Mammary Gland Biol Neoplasia* **8**(2): 205-14.
- Connolly, J. M., Gilhooly, E. M. and Rose, D. P. (1999). "Effects of reduced dietary linoleic acid intake, alone or combined with an algal source of docosahexaenoic acid, on MDA-MB-231 breast cancer cell growth and apoptosis in nude mice." *Nutr Cancer* **35**(1): 44-9.
- Cooke, A. (2006). "Th17 cells in inflammatory conditions." *Rev Diabet Stud* **3**(2): 72-5.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A. and Caligiuri, M. A. (2001a). "The biology of human natural killer-cell subsets." *Trends Immunol* **22**(11): 633-40.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Turner, S. C., Chen, K. S., Ghaheri, B. A., Ghayur, T., Carson, W. E. and Caligiuri, M. A. (2001b). "Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset." *Blood* **97**(10): 3146-51.
- Cooper, M. A., Bush, J. E., Fehniger, T. A., VanDeusen, J. B., Waite, R. E., Liu, Y., Aguila, H. L. and Caligiuri, M. A. (2002). "In vivo evidence for a dependence on interleukin 15 for survival of natural killer cells." *Blood* **100**(10): 3633-8.
- Cooper, M. A., Fehniger, T. A., Fuchs, A., Colonna, M. and Caligiuri, M. A. (2004). "NK cell and DC interactions." *Trends Immunol* **25**(1): 47-52.
- Cope, A. P. (2003). "Exploring the reciprocal relationship between immunity and inflammation in chronic inflammatory arthritis." *Rheumatology (Oxford)* **42**(6): 716-31.
- Corraliza, I. M., Soler, G., Eichmann, K. and Modolell, M. (1995). "Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow-derived macrophages." *Biochem Biophys Res Commun* **206**(2): 667-73.
- Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Kubin, M., Chin, W., Peterson, L. and Hsu, M. L. (1997). "A novel immunoglobulin superfamily receptor for cellular and viral MHC class I molecules." *Immunity* **7**(2): 273-82.
- Cosman, D., Mullberg, J., Sutherland, C. L., Chin, W., Armitage, R., Fanslow, W., Kubin, M. and Chalupny, N. J. (2001). "ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor." *Immunity* **14**(2): 123-33.
- Costello, R. T., Sivori, S., Marcenaro, E., Lafage-Pochitaloff, M., Mozziconacci, M. J., Reviron, D., Gastaut, J. A., Pende, D., Olive, D. and Moretta, A. (2002). "Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia." *Blood* **99**(10): 3661-7.

- Coudert, J. D., Coureau, C. and Guery, J. C. (2002). "Preventing NK cell activation by donor dendritic cells enhances allospecific CD4 T cell priming and promotes Th type 2 responses to transplantation antigens." *J Immunol* **169**(6): 2979-87.
 - Coudert, J. D., Zimmer, J., Tomasello, E., Cebecauer, M., Colonna, M., Vivier, E. and Held, W. (2005). "Altered NKG2D function in NK cells induced by chronic exposure to NKG2D ligand-expressing tumor cells." *Blood* **106**(5): 1711-7.
 - Couse, J. F. and Korach, K. S. (1999). "Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?" *Endocr Rev* **20**(3): 358-417.
 - Cousins, D. J., Staynov, D. Z. and Lee, T. H. (1994). "Regulation of interleukin-5 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor expression." *Am J Respir Crit Care Med* **150**(5 Pt 2): S50-3.
 - Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J. J. and Smyth, M. J. (2002). "Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice." *J Immunol* **168**(3): 1356-61.
 - Crisa, L., McMaster, M. T., Ishii, J. K., Fisher, S. J. and Salomon, D. R. (1997). "Identification of a thymic epithelial cell subset sharing expression of the class Ib HLA-G molecule with fetal trophoblasts." *J Exp Med* **186**(2): 289-98.
 - Critchley-Thorne, R. J., Simons, D. L., Yan, N., Miyahira, A. K., Dirbas, F. M., Johnson, D. L., Swetter, S. M., Carlson, R. W., Fisher, G. A., Koong, A., Holmes, S. and Lee, P. P. (2009). "Impaired interferon signaling is a common immune defect in human cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(22): 9010-5.
 - Croft, M. (2003). "Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity?" *Nat Rev Immunol* **3**(8): 609-20.
 - Cullen, S. P. and Martin, S. J. (2008). "Mechanisms of granule-dependent killing." *Cell Death Differ* **15**(2): 251-62.
 - Cullen, S. P., Brunet, M. and Martin, S. J. (2010). "Granzymes in cancer and immunity." *Cell Death Differ* **17**(4): 616-23.
 - Cunard, R., Ricote, M., DiCampi, D., Archer, D. C., Kahn, D. A., Glass, C. K. and Kelly, C. J. (2002). "Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors." *J Immunol* **168**(6): 2795-802.
 - Cupedo, T., Crellin, N. K., Papazian, N., Rombouts, E. J., Weijer, K., Grogan, J. L., Fibbe, W. E., Cornelissen, J. J. and Spits, H. (2009). "Human fetal lymphoid tissue-inducer cells are interleukin 17-producing precursors to RORC+ CD127+ natural killer-like cells." *Nat Immunol* **10**(1): 66-74.
 - Curiel, T. J., Coukos, G., Zou, L., Alvarez, X., Cheng, P., Mottram, P., Evdemon-Hogan, M., Conejo-Garcia, J. R., Zhang, L., Burow, M., Zhu, Y., Wei, S., Kryczek, I., Daniel, B., Gordon, A., Myers, L., Lackner, A., Disis, M. L., Knutson, K. L., Chen, L. and Zou, W. (2004). "Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival." *Nat Med* **10**(9): 942-9.
- D-
- D'Andrea, A., Chang, C., Franz-Bacon, K., McClanahan, T., Phillips, J. H. and Lanier, L. L. (1995). "Molecular cloning of NKB1. A natural killer cell receptor for HLA-B allotypes." *J Immunol* **155**(5): 2306-10.
 - D'Asaro, M., La Mendola, C., Di Liberto, D., Orlando, V., Todaro, M., Spina, M., Guggino, G., Meraviglia, S., Caccamo, N., Messina, A., Salerno, A., Di Raimondo, F., Vigneri, P., Stassi, G., Fournie, J. J. and Dieli, F. (2010). "V gamma 9V delta 2 T lymphocytes efficiently recognize and kill zoledronate-sensitized, imatinib-sensitive, and imatinib-resistant chronic myelogenous leukemia cells." *J Immunol* **184**(6): 3260-8.
 - Danforth, D. N. and Zhu, Y. (2005). "Conversion of Fas-resistant to Fas-sensitive MCF-7 breast cancer cells by the synergistic interaction of interferon-gamma and all-trans retinoic acid." *Breast Cancer Res Treat* **94**(1): 81-91.
 - Daniel, T. O., Liu, H., Morrow, J. D., Crews, B. C. and Marnett, L. J. (1999). "Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis." *Cancer Res* **59**(18): 4574-7.
 - Dann, S. G., Selvaraj, A. and Thomas, G. (2007). "mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer." *Trends Mol Med* **13**(6): 252-9.
 - Davel, L. E., Jasnis, M. A., de la Torre, E., Gotoh, T., Diamant, M., Magenta, G., Sacerdote de Lustig, E. and Sales, M. E. (2002). "Arginine metabolic pathways involved in the modulation of tumor-induced angiogenesis by macrophages." *FEBS Lett* **532**(1-2): 216-20.
 - Davies, B., Miles, D. W., Happerfield, L. C., Naylor, M. S., Bobrow, L. G., Rubens, R. D. and Balkwill, F. R. (1993a). "Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease." *Br J Cancer* **67**(5): 1126-31.
 - Davies, B., Waxman, J., Wasan, H., Abel, P., Williams, G., Krausz, T., Neal, D., Thomas, D., Hanby, A. and Balkwill, F. (1993b). "Levels of matrix metalloproteases in bladder cancer correlate with tumor grade and invasion." *Cancer Res* **53**(22): 5365-9.

- Davis, I. D., Skrumsager, B. K., Cebon, J., Nicholaou, T., Barlow, J. W., Moller, N. P., Skak, K., Lundsgaard, D., Frederiksen, K. S., Thygesen, P. and McArthur, G. A. (2007). "An open-label, two-arm, phase I trial of recombinant human interleukin-21 in patients with metastatic melanoma." *Clin Cancer Res* **13**(12): 3630-6.
- Davis, I. D., Brady, B., Kefford, R. F., Millward, M., Cebon, J., Skrumsager, B. K., Mouritzen, U., Hansen, L. T., Skak, K., Lundsgaard, D., Frederiksen, K. S., Kristjansen, P. E. and McArthur, G. (2009). "Clinical and biological efficacy of recombinant human interleukin-21 in patients with stage IV malignant melanoma without prior treatment: a phase IIa trial." *Clin Cancer Res* **15**(6): 2123-9.
- de Pablo, M. A., Ortega, E., Gallego, A. M., Alvarez, C., Pancorbo, P. L. and Alvarez de Cienfuegos, G. (1998). "The effect of dietary fatty acid manipulation on phagocytic activity and cytokine production by peritoneal cells from Balb/c mice." *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* **44**(1): 57-67.
- De Rosa, V., Procaccini, C., Cali, G., Pirozzi, G., Fontana, S., Zappacosta, S., La Cava, A. and Matarese, G. (2007). "A key role of leptin in the control of regulatory T cell proliferation." *Immunity* **26**(2): 241-55.
- de Waal Malefyt, R., Yssel, H. and de Vries, J. E. (1993). "Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation." *J Immunol* **150**(11): 4754-65.
- Debets, R., Timans, J. C., Churakowa, T., Zurawski, S., de Waal Malefyt, R., Moore, K. W., Abrams, J. S., O'Garra, A., Bazan, J. F. and Kastelein, R. A. (2000). "IL-18 receptors, their role in ligand binding and function: anti-IL-18 antibody, a potent antagonist of IL-18." *J Immunol* **165**(9): 4950-6.
- Defrance, T., Casamayor-Palleja, M. and Krammer, P. H. (2002). "The life and death of a B cell." *Adv Cancer Res* **86**: 195-225.
- DeFranco, A. L., Richards, J. D., Blum, J. H., Stevens, T. L., Law, D. A., Chan, V. W., Datta, S. K., Foy, S. P., Hourihane, S. L., Gold, M. R. and et al. (1995). "Signal transduction by the B-cell antigen receptor." *Ann N Y Acad Sci* **766**: 195-201.
- Degli-Esposti, M. (1999). "To die or not to die--the quest of the TRAIL receptors." *J Leukoc Biol* **65**(5): 535-42.
- Della Bella, S., Molteni, M., Compasso, S., Zulian, C., Vanoli, M. and Scorza, R. (1997). "Differential effects of cyclo-oxygenase pathway metabolites on cytokine production by T lymphocytes." *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **56**(3): 177-84.
- Della Chiesa, M., Vitale, M., Carlomagno, S., Ferlazzo, G., Moretta, L. and Moretta, A. (2003). "The natural killer cell-mediated killing of autologous dendritic cells is confined to a cell subset expressing CD94/NKG2A, but lacking inhibitory killer Ig-like receptors." *Eur J Immunol* **33**(6): 1657-66.
- Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Frumento, G., Balsamo, M., Cantoni, C., Conte, R., Moretta, L., Moretta, A. and Vitale, M. (2006). "The tryptophan catabolite L-kynurenine inhibits the surface expression of NKG2D- and NKG2A-activating receptors and regulates NK-cell function." *Blood* **108**(13): 4118-25.
- Della Chiesa, M., Romeo, E., Falco, M., Balsamo, M., Augugliaro, R., Moretta, L., Bottino, C., Moretta, A. and Vitale, M. (2008). "Evidence that the KIR2DS5 gene codes for a surface receptor triggering natural killer cell function." *Eur J Immunol* **38**(8): 2284-9.
- Deng, A., Chen, S., Li, Q., Lyu, S. C., Clayberger, C. and Krensky, A. M. (2005). "Granulysin, a cytolytic molecule, is also a chemoattractant and proinflammatory activator." *J Immunol* **174**(9): 5243-8.
- Deniz, G., Akdis, M., Aktas, E., Blaser, K. and Akdis, C. A. (2002). "Human NK1 and NK2 subsets determined by purification of IFN-gamma-secreting and IFN-gamma-nonsecreting NK cells." *Eur J Immunol* **32**(3): 879-84.
- Denys, A., Hichami, A. and Khan, N. A. (2001). "Eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid modulate MAP kinase (ERK1/ERK2) signaling in human T cells." *J Lipid Res* **42**(12): 2015-20.
- Derre, L., Corvaisier, M., Charreau, B., Moreau, A., Godefroy, E., Moreau-Aubry, A., Jotereau, F. and Gervois, N. (2006). "Expression and release of HLA-E by melanoma cells and melanocytes: potential impact on the response of cytotoxic effector cells." *J Immunol* **177**(5): 3100-7.
- Devchand, P. R., Keller, H., Peters, J. M., Vazquez, M., Gonzalez, F. J. and Wahli, W. (1996). "The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control." *Nature* **384**(6604): 39-43.
- Dewan, M. Z., Terunuma, H., Takada, M., Tanaka, Y., Abe, H., Sata, T., Toi, M. and Yamamoto, N. (2007). "Role of natural killer cells in hormone-independent rapid tumor formation and spontaneous metastasis of breast cancer cells in vivo." *Breast Cancer Res Treat* **104**(3): 267-75.
- Di Carlo, E., Comes, A., Basso, S., De Ambrosis, A., Meazza, R., Musiani, P., Moelling, K., Albin, A. and Ferrini, S. (2000a). "The combined action of IL-15 and IL-12 gene transfer can induce tumor cell rejection without T and NK cell involvement." *J Immunol* **165**(6): 3111-8.
- Di Carlo, E., Meazza, R., Basso, S., Rosso, O., Comes, A., Gaggero, A., Musiani, P., Santi, L. and Ferrini, S. (2000b). "Dissimilar anti-tumour reactions induced by tumour cells engineered with the interleukin-2 or interleukin-15 gene in nude mice." *J Pathol* **191**(2): 193-201.

- Di Carlo, E., Comes, A., Orengo, A. M., Rosso, O., Meazza, R., Musiani, P., Colombo, M. P. and Ferrini, S. (2004). "IL-21 induces tumor rejection by specific CTL and IFN-gamma-dependent CXC chemokines in syngeneic mice." *J Immunol* **172**(3): 1540-7.
- Di Santo, J. P. (2006). "Natural killer cell developmental pathways: a question of balance." *Annu Rev Immunol* **24**: 257-86.
- Diefenbach, A., Jamieson, A. M., Liu, S. D., Shastri, N. and Raulet, D. H. (2000). "Ligands for the murine NKG2D receptor: expression by tumor cells and activation of NK cells and macrophages." *Nat Immunol* **1**(2): 119-26.
- Diefenbach, A., Jensen, E. R., Jamieson, A. M. and Raulet, D. H. (2001). "Rae1 and H60 ligands of the NKG2D receptor stimulate tumour immunity." *Nature* **413**(6852): 165-71.
- Diefenbach, A., Tomasello, E., Lucas, M., Jamieson, A. M., Hsia, J. K., Vivier, E. and Raulet, D. H. (2002). "Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D." *Nat Immunol* **3**(12): 1142-9.
- DiLillo, D. J., Yanaba, K. and Tedder, T. F. (2010). "B cells are required for optimal CD4+ and CD8+ T cell tumor immunity: therapeutic B cell depletion enhances B16 melanoma growth in mice." *J Immunol* **184**(7): 4006-16.
- Dinarello, C. A. (1999). "Interleukin-18." *Methods* **19**(1): 121-32.
- Dohring, C., Scheidegger, D., Samaridis, J., Cella, M. and Colonna, M. (1996). "A human killer inhibitory receptor specific for HLA-A1,2." *J Immunol* **156**(9): 3098-101.
- Duncan, D. D. and Swain, S. L. (1994). "Role of antigen-presenting cells in the polarized development of helper T cell subsets: evidence for differential cytokine production by Th0 cells in response to antigen presentation by B cells and macrophages." *Eur J Immunol* **24**(10): 2506-14.
- Dunn, G. P., Koebel, C. M. and Schreiber, R. D. (2006). "Interferons, immunity and cancer immunoediting." *Nat Rev Immunol* **6**(11): 836-48.
- Dunn, S. E., Kari, F. W., French, J., Leininger, J. R., Travlos, G., Wilson, R. and Barrett, J. C. (1997). "Dietary restriction reduces insulin-like growth factor I levels, which modulates apoptosis, cell proliferation, and tumor progression in p53-deficient mice." *Cancer Res* **57**(21): 4667-72.
- Dunn, S. E., Ehrlich, M., Sharp, N. J., Reiss, K., Solomon, G., Hawkins, R., Baserga, R. and Barrett, J. C. (1998). "A dominant negative mutant of the insulin-like growth factor-I receptor inhibits the adhesion, invasion, and metastasis of breast cancer." *Cancer Res* **58**(15): 3353-61.
- E-
- Echchakir, H., Bagot, M., Dorothee, G., Martinvalet, D., Le Gouvello, S., Boumsell, L., Chouaib, S., Bensussan, A. and Mami-Chouaib, F. (2000). "Cutaneous T cell lymphoma reactive CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones display a Th1 cytokine profile and use a fas-independent pathway for specific tumor cell lysis." *J Invest Dermatol* **115**(1): 74-80.
- Eischen, C. M., Schilling, J. D., Lynch, D. H., Krammer, P. H. and Leibson, P. J. (1996). "Fc receptor-induced expression of Fas ligand on activated NK cells facilitates cell-mediated cytotoxicity and subsequent autocrine NK cell apoptosis." *J Immunol* **156**(8): 2693-9.
- Eisele, G., Wischhusen, J., Mittelbronn, M., Meyermann, R., Waldhauer, I., Steinle, A., Weller, M. and Friese, M. A. (2006). "TGF-beta and metalloproteinases differentially suppress NKG2D ligand surface expression on malignant glioma cells." *Brain* **129**(Pt 9): 2416-25.
- Ekholm, S. V. and Reed, S. I. (2000). "Regulation of G(1) cyclin-dependent kinases in the mammalian cell cycle." *Curr Opin Cell Biol* **12**(6): 676-84.
- El-Sherbiny, Y. M., Meade, J. L., Holmes, T. D., McGonagle, D., Mackie, S. L., Morgan, A. W., Cook, G., Feyler, S., Richards, S. J., Davies, F. E., Morgan, G. J. and Cook, G. P. (2007). "The requirement for DNAM-1, NKG2D, and Nkp46 in the natural killer cell-mediated killing of myeloma cells." *Cancer Res* **67**(18): 8444-9.
- Elliott, J. M. and Yokoyama, W. M. (2011). "Unifying concepts of MHC-dependent natural killer cell education." *Trends Immunol* **32**(8): 364-72.
- Endres, S. (1996). "n-3 polyunsaturated fatty acids and human cytokine synthesis." *Lipids* **31 Suppl**: S239-42.
- Esin, S., Batoni, G., Counoupas, C., Stringaro, A., Brancatisano, F. L., Colone, M., Maisetta, G., Florio, W., Arancia, G. and Campa, M. (2008). "Direct binding of human NK cell natural cytotoxicity receptor NKG2D to the surfaces of mycobacteria and other bacteria." *Infect Immun* **76**(4): 1719-27.
- F-
- Fafournoux, P., Bruhat, A. and Jousse, C. (2000). "Amino acid regulation of gene expression." *Biochem J* **351**(Pt 1): 1-12.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M. C. and Puccetti, P. (2002). "T cell apoptosis by tryptophan catabolism." *Cell Death Differ* **9**(10): 1069-77.

- Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B. C., Cavener, D. R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M. L., Volpi, C., Santamaria, P., Fioretti, M. C. and Puccetti, P. (2006). "The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells." *J Immunol* **176**(11): 6752-61.
- Falschlehner, C., Schaefer, U. and Walczak, H. (2009). "Following TRAIL's path in the immune system." *Immunology* **127**(2): 145-54.
- Fan, Y. Y., McMurray, D. N., Ly, L. H. and Chapkin, R. S. (2003). "Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids remodel mouse T-cell lipid rafts." *J Nutr* **133**(6): 1913-20.
- Fan, Y. Y., Ly, L. H., Barhoumi, R., McMurray, D. N. and Chapkin, R. S. (2004). "Dietary docosahexaenoic acid suppresses T cell protein kinase C theta lipid raft recruitment and IL-2 production." *J Immunol* **173**(10): 6151-60.
- Fan, Z., Beresford, P. J., Oh, D. Y., Zhang, D. and Lieberman, J. (2003). "Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor." *Cell* **112**(5): 659-72.
- Fanger, N. A., Cosman, D., Peterson, L., Braddy, S. C., Maliszewski, C. R. and Borges, L. (1998). "The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes." *Eur J Immunol* **28**(11): 3423-34.
- Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunker, A. T. and Jahn, R. (1998). "Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26): 15781-6.
- Faure-Andre, G., Vargas, P., Yuseff, M. I., Heuze, M., Diaz, J., Lankar, D., Steri, V., Manry, J., Hugues, S., Vascotto, F., Boulanger, J., Raposo, G., Bono, M. R., Roseblatt, M., Piel, M. and Lennon-Dumenil, A. M. (2008). "Regulation of dendritic cell migration by CD74, the MHC class II-associated invariant chain." *Science* **322**(5908): 1705-10.
- Faure, M. and Long, E. O. (2002). "KIR2DL4 (CD158d), an NK cell-activating receptor with inhibitory potential." *J Immunol* **168**(12): 6208-14.
- Fauriat, C., Moretta, A., Olive, D. and Costello, R. T. (2005). "Defective killing of dendritic cells by autologous natural killer cells from acute myeloid leukemia patients." *Blood* **106**(6): 2186-8.
- Favier, B., Lemaoult, J., Lesport, E. and Carosella, E. D. (2010). "ILT2/HLA-G interaction impairs NK-cell functions through the inhibition of the late but not the early events of the NK-cell activating synapse." *FASEB J* **24**(3): 689-99.
- Fay, M. P., Freedman, L. S., Clifford, C. K. and Midthune, D. N. (1997). "Effect of different types and amounts of fat on the development of mammary tumors in rodents: a review." *Cancer Res* **57**(18): 3979-88.
- Fearnside, J. F., Dumas, M. E., Rothwell, A. R., Wilder, S. P., Cloarec, O., Teye, A., Blancher, C., Holmes, E., Tatoud, R., Barton, R. H., Scott, J., Nicholson, J. K. and Gauguier, D. (2008). "Phylometabonomic patterns of adaptation to high fat diet feeding in inbred mice." *PLoS One* **3**(2): e1668.
- Fehniger, T. A., Herbein, G., Yu, H., Para, M. I., Bernstein, Z. P., O'Brien, W. A. and Caligiuri, M. A. (1998). "Natural killer cells from HIV-1+ patients produce C-C chemokines and inhibit HIV-1 infection." *J Immunol* **161**(11): 6433-8.
- Fehniger, T. A., Cooper, M. A., Nuovo, G. J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M. and Caligiuri, M. A. (2003). "CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity." *Blood* **101**(8): 3052-7.
- Ferguson, M. M. and McDonald, F. G. (1985). "Oestrogen as an inhibitor of human NK cell cytotoxicity." *FEBS Lett* **191**(1): 145-8.
- Ferlay, J., Shin, H. R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C. and Parkin, D. M. (2010). "Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008." *Int J Cancer* **127**(12): 2893-917.
- Ferlazzo, G., Morandi, B., D'Agostino, A., Meazza, R., Melioli, G., Moretta, A. and Moretta, L. (2003). "The interaction between NK cells and dendritic cells in bacterial infections results in rapid induction of NK cell activation and in the lysis of uninfected dendritic cells." *Eur J Immunol* **33**(2): 306-13.
- Ferlazzo, G., Pack, M., Thomas, D., Paludan, C., Schmid, D., Strowig, T., Bougras, G., Muller, W. A., Moretta, L. and Munz, C. (2004a). "Distinct roles of IL-12 and IL-15 in human natural killer cell activation by dendritic cells from secondary lymphoid organs." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(47): 16606-11.
- Ferlazzo, G., Thomas, D., Lin, S. L., Goodman, K., Morandi, B., Muller, W. A., Moretta, A. and Munz, C. (2004b). "The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytotoxic." *J Immunol* **172**(3): 1455-62.
- Fernandez-Riejos, P., Najib, S., Santos-Alvarez, J., Martin-Romero, C., Perez-Perez, A., Gonzalez-Yanes, C. and Sanchez-Margalet, V. (2010). "Role of leptin in the activation of immune cells." *Mediators Inflamm* **2010**: 568343.

- Fernandez, E. J. and Lolis, E. (2002). "Structure, function, and inhibition of chemokines." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **42**: 469-99.
- Fernandez, N. C., Treiner, E., Vance, R. E., Jamieson, A. M., Lemieux, S. and Raulet, D. H. (2005). "A subset of natural killer cells achieves self-tolerance without expressing inhibitory receptors specific for self-MHC molecules." *Blood* **105**(11): 4416-23.
- Fernando, R. I. and Wimalasena, J. (2004). "Estradiol abrogates apoptosis in breast cancer cells through inactivation of BAD: Ras-dependent nongenomic pathways requiring signaling through ERK and Akt." *Mol Biol Cell* **15**(7): 3266-84.
- Ferrara, N. and Davis-Smyth, T. (1997). "The biology of vascular endothelial growth factor." *Endocr Rev* **18**(1): 4-25.
- Ferrarini, M., Ferrero, E., Dagna, L., Poggi, A. and Zocchi, M. R. (2002). "Human gammadelta T cells: a nonredundant system in the immune-surveillance against cancer." *Trends Immunol* **23**(1): 14-8.
- Ferre, P. (2004). "The biology of peroxisome proliferator-activated receptors: relationship with lipid metabolism and insulin sensitivity." *Diabetes* **53 Suppl 1**: S43-50.
- Filipazzi, P., Valenti, R., Huber, V., Pilla, L., Canese, P., Iero, M., Castelli, C., Mariani, L., Parmiani, G. and Rivoltini, L. (2007). "Identification of a new subset of myeloid suppressor cells in peripheral blood of melanoma patients with modulation by a granulocyte-macrophage colony-stimulation factor-based antitumor vaccine." *J Clin Oncol* **25**(18): 2546-53.
- Finkel, T. and Holbrook, N. J. (2000). "Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing." *Nature* **408**(6809): 239-47.
- Fisher, M., Levine, P. H., Weiner, B. H., Johnson, M. H., Doyle, E. M., Ellis, P. A. and Hoogasian, J. J. (1990). "Dietary n-3 fatty acid supplementation reduces superoxide production and chemiluminescence in a monocyte-enriched preparation of leukocytes." *Am J Clin Nutr* **51**(5): 804-8.
- Fontenot, J. D., Gavin, M. A. and Rudensky, A. Y. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." *Nat Immunol* **4**(4): 330-6.
- Frankenberry, K. A., Skinner, H., Somasundar, P., McFadden, D. W. and Vona-Davis, L. C. (2006). "Leptin receptor expression and cell signaling in breast cancer." *Int J Oncol* **28**(4): 985-93.
- Frederiksen, K. S., Lundsgaard, D., Freeman, J. A., Hughes, S. D., Holm, T. L., Skrumsager, B. K., Petri, A., Hansen, L. T., McArthur, G. A., Davis, I. D. and Skak, K. (2008). "IL-21 induces in vivo immune activation of NK cells and CD8(+) T cells in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma." *Cancer Immunol Immunother* **57**(10): 1439-49.
- Freud, A. G., Becknell, B., Roychowdhury, S., Mao, H. C., Ferketich, A. K., Nuovo, G. J., Hughes, T. L., Marburger, T. B., Sung, J., Baiocchi, R. A., Guimond, M. and Caligiuri, M. A. (2005). "A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56bright natural killer cells." *Immunity* **22**(3): 295-304.
- Freud, A. G. and Caligiuri, M. A. (2006). "Human natural killer cell development." *Immunol Rev* **214**: 56-72.
- Freud, A. G., Yokohama, A., Becknell, B., Lee, M. T., Mao, H. C., Ferketich, A. K. and Caligiuri, M. A. (2006). "Evidence for discrete stages of human natural killer cell differentiation in vivo." *J Exp Med* **203**(4): 1033-43.
- Fricke, I. and Gabrilovich, D. I. (2006). "Dendritic cells and tumor microenvironment: a dangerous liaison." *Immunol Invest* **35**(3-4): 459-83.
- Friese, M. A., Wischhusen, J., Wick, W., Weiler, M., Eisele, G., Steinle, A. and Weller, M. (2004). "RNA interference targeting transforming growth factor-beta enhances NKG2D-mediated antiglioma immune response, inhibits glioma cell migration and invasiveness, and abrogates tumorigenicity in vivo." *Cancer Res* **64**(20): 7596-603.
- Fruhbeck, G. (2006). "Intracellular signalling pathways activated by leptin." *Biochem J* **393**(Pt 1): 7-20.
- Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U. and Ferrara, G. B. (2002). "Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase." *J Exp Med* **196**(4): 459-68.
- Fu, J., Xu, D., Liu, Z., Shi, M., Zhao, P., Fu, B., Zhang, Z., Yang, H., Zhang, H., Zhou, C., Yao, J., Jin, L., Wang, H., Yang, Y., Fu, Y. X. and Wang, F. S. (2007). "Increased regulatory T cells correlate with CD8 T-cell impairment and poor survival in hepatocellular carcinoma patients." *Gastroenterology* **132**(7): 2328-39.
- Fujita, Y., Murakami, M., Ogawa, Y., Masuzaki, H., Tanaka, M., Ozaki, S., Nakao, K. and Mimori, T. (2002). "Leptin inhibits stress-induced apoptosis of T lymphocytes." *Clin Exp Immunol* **128**(1): 21-6.
- Fukushima, Y., Oshika, Y., Nakamura, M., Tokunaga, T., Hatanaka, H., Abe, Y., Yamazaki, H., Kijima, H., Ueyama, Y. and Tamaoki, N. (1998). "Increased expression of human histocompatibility leukocyte antigen-G in colorectal cancer cells." *Int J Mol Med* **2**(3): 349-51.

- Fulda, S., Scaffidi, C., Pietsch, T., Krammer, P. H., Peter, M. E. and Debatin, K. M. (1998a). "Activation of the CD95 (APO-1/Fas) pathway in drug- and gamma-irradiation-induced apoptosis of brain tumor cells." *Cell Death Differ* **5**(10): 884-93.
 - Fulda, S., Susin, S. A., Kroemer, G. and Debatin, K. M. (1998b). "Molecular ordering of apoptosis induced by anticancer drugs in neuroblastoma cells." *Cancer Res* **58**(19): 4453-60.
 - Funahashi, H., Satake, M., Hasan, S., Sawai, H., Newman, R. A., Reber, H. A., Hines, O. J. and Eibl, G. (2008). "Opposing effects of n-6 and n-3 polyunsaturated fatty acids on pancreatic cancer growth." *Pancreas* **36**(4): 353-62.
 - Funk, C. D. (2001). "Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology." *Science* **294**(5548): 1871-5.
 - Furuke, K., Burd, P. R., Horvath-Arcidiacono, J. A., Hori, K., Mostowski, H. and Bloom, E. T. (1999). "Human NK cells express endothelial nitric oxide synthase, and nitric oxide protects them from activation-induced cell death by regulating expression of TNF-alpha." *J Immunol* **163**(3): 1473-80.
- G-
- Gabrilovich, D., Ishida, T., Oyama, T., Ran, S., Kravtsov, V., Nadaf, S. and Carbone, D. P. (1998). "Vascular endothelial growth factor inhibits the development of dendritic cells and dramatically affects the differentiation of multiple hematopoietic lineages in vivo." *Blood* **92**(11): 4150-66.
 - Gabrilovich, D. I., Chen, H. L., Girgis, K. R., Cunningham, H. T., Meny, G. M., Nadaf, S., Kavanaugh, D. and Carbone, D. P. (1996). "Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells." *Nat Med* **2**(10): 1096-103.
 - Gabrilovich, D. I. and Nagaraj, S. (2009). "Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system." *Nat Rev Immunol* **9**(3): 162-74.
 - Gaffen, S. L. (2001). "Signaling domains of the interleukin 2 receptor." *Cytokine* **14**(2): 63-77.
 - Gallina, G., Dolcetti, L., Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Colombo, M. P., Basso, G., Brombacher, F., Borrello, I., Zanovello, P., Biccato, S. and Bronte, V. (2006). "Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells." *J Clin Invest* **116**(10): 2777-90.
 - Galy, A., Travis, M., Cen, D. and Chen, B. (1995). "Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset." *Immunity* **3**(4): 459-73.
 - Gao, X., Zhang, Y., Arrazola, P., Hino, O., Kobayashi, T., Yeung, R. S., Ru, B. and Pan, D. (2002). "Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling." *Nat Cell Biol* **4**(9): 699-704.
 - Garcia-Lora, A., Algarra, I. and Garrido, F. (2003). "MHC class I antigens, immune surveillance, and tumor immune escape." *J Cell Physiol* **195**(3): 346-55.
 - Gardiner, C. M. (2008). "Killer cell immunoglobulin-like receptors on NK cells: the how, where and why." *Int J Immunogenet* **35**(1): 1-8.
 - Garg, A., Barnes, P. F., Porgador, A., Roy, S., Wu, S., Nanda, J. S., Griffith, D. E., Girard, W. M., Rawal, N., Shetty, S. and Vankayalapati, R. (2006). "Vimentin expressed on Mycobacterium tuberculosis-infected human monocytes is involved in binding to the Nkp46 receptor." *J Immunol* **177**(9): 6192-8.
 - Garrity, D., Call, M. E., Feng, J. and Wucherpfennig, K. W. (2005). "The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(21): 7641-6.
 - Gasparini, G., Longo, R., Sarmiento, R. and Morabito, A. (2003). "Inhibitors of cyclo-oxygenase 2: a new class of anticancer agents?" *Lancet Oncol* **4**(10): 605-15.
 - Gastman, B. R., Atarshi, Y., Reichert, T. E., Saito, T., Balkir, L., Rabinowich, H. and Whiteside, T. L. (1999). "Fas ligand is expressed on human squamous cell carcinomas of the head and neck, and it promotes apoptosis of T lymphocytes." *Cancer Res* **59**(20): 5356-64.
 - Gately, M. K., Renzetti, L. M., Magram, J., Stern, A. S., Adorini, L., Gubler, U. and Presky, D. H. (1998). "The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses." *Annu Rev Immunol* **16**: 495-521.
 - Gerber, M. (2009). "Background review paper on total fat, fatty acid intake and cancers." *Ann Nutr Metab* **55**(1-3): 140-61.
 - Gerosa, F., Gobbi, A., Zorzi, P., Burg, S., Briere, F., Carra, G. and Trinchieri, G. (2005). "The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions." *J Immunol* **174**(2): 727-34.
 - Ghiringhelli, F., Menard, C., Terme, M., Flament, C., Taieb, J., Chaput, N., Puig, P. E., Novault, S., Escudier, B., Vivier, E., Lécésne, A., Robert, C., Blay, J. Y., Bernard, J., Caillat-Zucman, S., Freitas, A., Tursz, T., Wagner-Ballon, O., Capron, C., Vainchenker, W., Martin, F. and Zitvogel, L. (2005a). "CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner." *J Exp Med* **202**(8): 1075-85.

- Ghiringhelli, F., Puig, P. E., Roux, S., Parcellier, A., Schmitt, E., Solary, E., Kroemer, G., Martin, F., Chauffert, B. and Zitvogel, L. (2005b). "Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation." *J Exp Med* **202**(7): 919-29.
- Ghiringhelli, F., Menard, C., Martin, F. and Zitvogel, L. (2006). "The role of regulatory T cells in the control of natural killer cells: relevance during tumor progression." *Immunol Rev* **214**: 229-38.
- Ghoreschi, K., Laurence, A. and O'Shea, J. J. (2009). "Janus kinases in immune cell signaling." *Immunol Rev* **228**(1): 273-87.
- Giancarlo, B., Silvano, S., Albert, Z., Mantovani, A. and Allavena, P. (1996). "Migratory response of human natural killer cells to lymphotactin." *Eur J Immunol* **26**(12): 3238-41.
- Girardi, M., Oppenheim, D. E., Steele, C. R., Lewis, J. M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R. E. and Hayday, A. C. (2001). "Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells." *Science* **294**(5542): 605-9.
- Godden, J., Leake, R. and Kerr, D. J. (1992). "The response of breast cancer cells to steroid and peptide growth factors." *Anticancer Res* **12**(5): 1683-8.
- Godfrey, D. I. and Berzins, S. P. (2007). "Control points in NKT-cell development." *Nat Rev Immunol* **7**(7): 505-18.
- Gomez, J. M., Maravall, F. J., Gomez, N., Navarro, M. A., Casamitjana, R. and Soler, J. (2003). "Interactions between serum leptin, the insulin-like growth factor-I system, and sex, age, anthropometric and body composition variables in a healthy population randomly selected." *Clin Endocrinol (Oxf)* **58**(2): 213-9.
- Gonzalez, R. R., Cherfils, S., Escobar, M., Yoo, J. H., Carino, C., Styer, A. K., Sullivan, B. T., Sakamoto, H., Olawaiye, A., Serikawa, T., Lynch, M. P. and Rueda, B. R. (2006). "Leptin signaling promotes the growth of mammary tumors and increases the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor type two (VEGF-R2)." *J Biol Chem* **281**(36): 26320-8.
- Goodridge, J. P., Witt, C. S., Christiansen, F. T. and Warren, H. S. (2003). "KIR2DL4 (CD158d) genotype influences expression and function in NK cells." *J Immunol* **171**(4): 1768-74.
- Goodridge, J. P., Lathbury, L. J., Steiner, N. K., Shulze, C. N., Pullikotil, P., Seidah, N. G., Hurley, C. K., Christiansen, F. T. and Witt, C. S. (2007). "Three common alleles of KIR2DL4 (CD158d) encode constitutively expressed, inducible and secreted receptors in NK cells." *Eur J Immunol* **37**(1): 199-211.
- Goodridge, J. P., Lathbury, L. J., John, E., Charles, A. K., Christiansen, F. T. and Witt, C. S. (2009). "The genotype of the NK cell receptor, KIR2DL4, influences INFgamma secretion by decidual natural killer cells." *Mol Hum Reprod* **15**(8): 489-97.
- Gorelik, L. and Flavell, R. A. (2001). "Immune-mediated eradication of tumors through the blockade of transforming growth factor-beta signaling in T cells." *Nat Med* **7**(10): 1118-22.
- Gouaze, V., Andrieu-Abadie, N., Cuvillier, O., Malagarie-Cazenave, S., Frisach, M. F., Mirault, M. E. and Levade, T. (2002). "Glutathione peroxidase-1 protects from CD95-induced apoptosis." *J Biol Chem* **277**(45): 42867-74.
- Graef, T., Moesta, A. K., Norman, P. J., Abi-Rached, L., Vago, L., Older Aguilar, A. M., Gleimer, M., Hammond, J. A., Guethlein, L. A., Bushnell, D. A., Robinson, P. J. and Parham, P. (2009). "KIR2DS4 is a product of gene conversion with KIR3DL2 that introduced specificity for HLA-A*11 while diminishing avidity for HLA-C." *J Exp Med* **206**(11): 2557-72.
- Graham, D. B., Cella, M., Giurisato, E., Fujikawa, K., Miletic, A. V., Kloeppel, T., Brim, K., Takai, T., Shaw, A. S., Colonna, M. and Swat, W. (2006). "Vav1 controls DAP10-mediated natural cytotoxicity by regulating actin and microtubule dynamics." *J Immunol* **177**(4): 2349-55.
- Grakoui, A., Bromley, S. K., Sumen, C., Davis, M. M., Shaw, A. S., Allen, P. M. and Dustin, M. L. (1999). "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation." *Science* **285**(5425): 221-7.
- Granato, D., Blum, S., Rossle, C., Le Boucher, J., Malnoe, A. and Dutot, G. (2000). "Effects of parenteral lipid emulsions with different fatty acid composition on immune cell functions in vitro." *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **24**(2): 113-8.
- Grawunder, U. and Harfst, E. (2001). "How to make ends meet in V(D)J recombination." *Curr Opin Immunol* **13**(2): 186-94.
- Greenberg, P. D. (1991). "Adoptive T cell therapy of tumors: mechanisms operative in the recognition and elimination of tumor cells." *Adv Immunol* **49**: 281-355.
- Greenwald, R. J., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H. (2005). "The B7 family revisited." *Annu Rev Immunol* **23**: 515-48.
- Gregoire, C., Chasson, L., Luci, C., Tomasello, E., Geissmann, F., Vivier, E. and Walzer, T. (2007). "The trafficking of natural killer cells." *Immunol Rev* **220**: 169-82.
- Grek, C. L. and Tew, K. D. (2010). "Redox metabolism and malignancy." *Curr Opin Pharmacol* **10**(4): 362-8.
- Grimshaw, M. J. and Balkwill, F. R. (2001). "Inhibition of monocyte and macrophage chemotaxis by hypoxia and inflammation--a potential mechanism." *Eur J Immunol* **31**(2): 480-9.

- Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M. and Spies, T. (1996). "Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(22): 12445-50.
 - Groh, V., Rhinehart, R., Secrist, H., Bauer, S., Grabstein, K. H. and Spies, T. (1999). "Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(12): 6879-84.
 - Groh, V., Rhinehart, R., Randolph-Habecker, J., Topp, M. S., Riddell, S. R. and Spies, T. (2001). "Costimulation of CD8alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells." Nat Immunol **2**(3): 255-60.
 - Groh, V., Wu, J., Yee, C. and Spies, T. (2002). "Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation." Nature **419**(6908): 734-8.
 - Groh, V., Bruhl, A., El-Gabalawy, H., Nelson, J. L. and Spies, T. (2003). "Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(16): 9452-7.
 - Grohmann, U., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Orabona, C., Ayroldi, E., Fioretti, M. C. and Puccetti, P. (1998). "IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production." Immunity **9**(3): 315-23.
 - Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M. L., Bianchi, R., Fioretti, M. C. and Puccetti, P. (2002). "CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo." Nat Immunol **3**(11): 1097-101.
 - Gruen, M. L., Hao, M., Piston, D. W. and Hasty, A. H. (2007). "Leptin requires canonical migratory signaling pathways for induction of monocyte and macrophage chemotaxis." Am J Physiol Cell Physiol **293**(5): C1481-8.
 - Gu, J. W., Young, E., Patterson, S. G., Makey, K. L., Wells, J., Huang, M., Tucker, K. B. and Miele, L. (2011). "Postmenopausal obesity promotes tumor angiogenesis and breast cancer progression in mice." Cancer Biol Ther **11**(10): 910-7.
 - Guerra, N., Tan, Y. X., Joncker, N. T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N. M. and Raulet, D. H. (2008). "NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy." Immunity **28**(4): 571-80.
 - Guma, M., Budt, M., Saez, A., Brckalo, T., Hengel, H., Angulo, A. and Lopez-Botet, M. (2006). "Expansion of CD94/NKG2C+ NK cells in response to human cytomegalovirus-infected fibroblasts." Blood **107**(9): 3624-31.
 - Gumperz, J. E., Litwin, V., Phillips, J. H., Lanier, L. L. and Parham, P. (1995). "The Bw4 public epitope of HLA-B molecules confers reactivity with natural killer cell clones that express NKB1, a putative HLA receptor." J Exp Med **181**(3): 1133-44.
 - Gupta, S., Weiss, A., Kumar, G., Wang, S. and Nel, A. (1994). "The T-cell antigen receptor utilizes Lck, Raf-1, and MEK-1 for activating mitogen-activated protein kinase. Evidence for the existence of a second protein kinase C-dependent pathway in an Lck-negative Jurkat cell mutant." J Biol Chem **269**(25): 17349-57.
- H-
- Haicheur, N., Escudier, B., Dorval, T., Negrier, S., De Mulder, P. H., Dupuy, J. M., Novick, D., Guillot, T., Wolf, S., Pouillart, P., Fridman, W. H. and Tartour, E. (2000). "Cytokines and soluble cytokine receptor induction after IL-12 administration in cancer patients." Clin Exp Immunol **119**(1): 28-37.
 - Hallett, W. H. and Murphy, W. J. (2006). "Positive and negative regulation of Natural Killer cells: therapeutic implications." Semin Cancer Biol **16**(5): 367-82.
 - Hamilton, B. S., Paglia, D., Kwan, A. Y. and Deitel, M. (1995). "Increased obese mRNA expression in omental fat cells from massively obese humans." Nat Med **1**(9): 953-6.
 - Hammes, S. R. and Levin, E. R. (2007). "Extranuclear steroid receptors: nature and actions." Endocr Rev **28**(7): 726-41.
 - Hanahan, D. and Weinberg, R. A. (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-74.
 - Hanke, T., Takizawa, H., McMahon, C. W., Busch, D. H., Pamer, E. G., Miller, J. D., Altman, J. D., Liu, Y., Cado, D., Lemonnier, F. A., Bjorkman, P. J. and Raulet, D. H. (1999). "Direct assessment of MHC class I binding by seven Ly49 inhibitory NK cell receptors." Immunity **11**(1): 67-77.
 - Hankinson, S. E., Willett, W. C., Colditz, G. A., Hunter, D. J., Michaud, D. S., Deroo, B., Rosner, B., Speizer, F. E. and Pollak, M. (1998). "Circulating concentrations of insulin-like growth factor-I and risk of breast cancer." Lancet **351**(9113): 1393-6.
 - Hanks, S. K., Ryzhova, L., Shin, N. Y. and Brabek, J. (2003). "Focal adhesion kinase signaling activities and their implications in the control of cell survival and motility." Front Biosci **8**: d982-96.

- Hanna, J., Gonen-Gross, T., Fitchett, J., Rowe, T., Daniels, M., Arnon, T. I., Gazit, R., Joseph, A., Schjetne, K. W., Steinle, A., Porgador, A., Mevorach, D., Goldman-Wohl, D., Yagel, S., LaBarre, M. J., Buckner, J. H. and Mandelboim, O. (2004). "Novel APC-like properties of human NK cells directly regulate T cell activation." *J Clin Invest* **114**(11): 1612-23.
- Hansasuta, P., Dong, T., Thananchai, H., Weekes, M., Willberg, C., Aldemir, H., Rowland-Jones, S. and Braud, V. M. (2004). "Recognition of HLA-A3 and HLA-A11 by KIR3DL2 is peptide-specific." *Eur J Immunol* **34**(6): 1673-9.
- Hao, S., Zhao, J., Zhou, J., Zhao, S., Hu, Y. and Hou, Y. (2007). "Modulation of 17beta-estradiol on the number and cytotoxicity of NK cells in vivo related to MCM and activating receptors." *Int Immunopharmacol* **7**(13): 1765-75.
- Hao, S., Li, P., Zhao, J., Hu, Y. and Hou, Y. (2008). "17beta-estradiol suppresses cytotoxicity and proliferative capacity of murine splenic NK1.1+ cells." *Cell Mol Immunol* **5**(5): 357-64.
- Hardy, S., Langelier, Y. and Prentki, M. (2000). "Oleate activates phosphatidylinositol 3-kinase and promotes proliferation and reduces apoptosis of MDA-MB-231 breast cancer cells, whereas palmitate has opposite effects." *Cancer Res* **60**(22): 6353-8.
- Hardy, S., St-Onge, G. G., Joly, E., Langelier, Y. and Prentki, M. (2005). "Oleate promotes the proliferation of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor GPR40." *J Biol Chem* **280**(14): 13285-91.
- Harris, S. G. and Phipps, R. P. (2001). "The nuclear receptor PPAR gamma is expressed by mouse T lymphocytes and PPAR gamma agonists induce apoptosis." *Eur J Immunol* **31**(4): 1098-105.
- Harris, S. G., Padilla, J., Koumas, L., Ray, D. and Phipps, R. P. (2002). "Prostaglandins as modulators of immunity." *Trends Immunol* **23**(3): 144-50.
- Hartmann, E., Wollenberg, B., Rothenfusser, S., Wagner, M., Wellisch, D., Mack, B., Giese, T., Gires, O., Endres, S. and Hartmann, G. (2003). "Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer." *Cancer Res* **63**(19): 6478-87.
- Hashimoto, W., Osaki, T., Okamura, H., Robbins, P. D., Kurimoto, M., Nagata, S., Lotze, M. T. and Tahara, H. (1999). "Differential antitumor effects of administration of recombinant IL-18 or recombinant IL-12 are mediated primarily by Fas-Fas ligand- and perforin-induced tumor apoptosis, respectively." *J Immunol* **163**(2): 583-9.
- Hausman, D. B., DiGirolamo, M., Bartness, T. J., Hausman, G. J. and Martin, R. J. (2001). "The biology of white adipocyte proliferation." *Obes Rev* **2**(4): 239-54.
- Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., Van Kaer, L., Saiki, I. and Okumura, K. (2001). "Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways." *J Immunol* **166**(10): 6012-8.
- Hayami, K., Fukuta, D., Nishikawa, Y., Yamashita, Y., Inui, M., Ohyama, Y., Hikida, M., Ohmori, H. and Takai, T. (1997). "Molecular cloning of a novel murine cell-surface glycoprotein homologous to killer cell inhibitory receptors." *J Biol Chem* **272**(11): 7320-7.
- Hecht, M. L., Rosental, B., Horlacher, T., Hershkovitz, O., De Paz, J. L., Noti, C., Schauer, S., Porgador, A. and Seeberger, P. H. (2009). "Natural cytotoxicity receptors NKp30, NKp44 and NKp46 bind to different heparan sulfate/heparin sequences." *J Proteome Res* **8**(2): 712-20.
- Hedlund, T. E., Meech, S. J., Srikanth, S., Kraft, A. S., Miller, G. J., Schaack, J. B. and Duke, R. C. (1999). "Adenovirus-mediated expression of Fas ligand induces apoptosis of human prostate cancer cells." *Cell Death Differ* **6**(2): 175-82.
- Helander, T. S., Carpen, O., Turunen, O., Kovanen, P. E., Vaheri, A. and Timonen, T. (1996). "ICAM-2 redistributed by ezrin as a target for killer cells." *Nature* **382**(6588): 265-8.
- Hernandez, G. L., Volpert, O. V., Iniguez, M. A., Lorenzo, E., Martinez-Martinez, S., Grau, R., Fresno, M. and Redondo, J. M. (2001). "Selective inhibition of vascular endothelial growth factor-mediated angiogenesis by cyclosporin A: roles of the nuclear factor of activated T cells and cyclooxygenase 2." *J Exp Med* **193**(5): 607-20.
- Hershkovitz, O., Jivov, S., Bloushtain, N., Zilka, A., Landau, G., Bar-Ilan, A., Lichtenstein, R. G., Campbell, K. S., van Kuppevelt, T. H. and Porgador, A. (2007). "Characterization of the recognition of tumor cells by the natural cytotoxicity receptor, NKp44." *Biochemistry* **46**(25): 7426-36.
- Hershkovitz, O., Rosental, B., Rosenberg, L. A., Navarro-Sanchez, M. E., Jivov, S., Zilka, A., Gershoni-Yahalom, O., Briant-Litzler, E., Bedouelle, H., Ho, J. W., Campbell, K. S., Rager-Zisman, B., Despres, P. and Porgador, A. (2009). "NKp44 receptor mediates interaction of the envelope glycoproteins from the West Nile and dengue viruses with NK cells." *J Immunol* **183**(4): 2610-21.
- Hesse, M., Modolell, M., La Flamme, A. C., Schito, M., Fuentes, J. M., Cheever, A. W., Pearce, E. J. and Wynn, T. A. (2001). "Differential regulation of nitric oxide synthase-2 and arginase-1 by type 1/type 2 cytokines in vivo: granulomatous pathology is shaped by the pattern of L-arginine metabolism." *J Immunol* **167**(11): 6533-44.

- Hildeman, D. A., Mitchell, T., Aronow, B., Wojciechowski, S., Kappler, J. and Marrack, P. (2003). "Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(25): 15035-40.
- Hirasawa, A., Tsumaya, K., Awaji, T., Katsuma, S., Adachi, T., Yamada, M., Sugimoto, Y., Miyazaki, S. and Tsujimoto, G. (2005). "Free fatty acids regulate gut incretin glucagon-like peptide-1 secretion through GPR120." *Nat Med* **11**(1): 90-4.
- Hodges-Gallagher, L., Valentine, C. D., El Bader, S. and Kushner, P. J. (2008). "Estrogen receptor beta increases the efficacy of antiestrogens by effects on apoptosis and cell cycling in breast cancer cells." *Breast Cancer Res Treat* **109**(2): 241-50.
- Hoechst, B., Voigtlaender, T., Ormandy, L., Gamrekashvili, J., Zhao, F., Wedemeyer, H., Lehner, F., Manns, M. P., Greten, T. F. and Korangy, F. (2009). "Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor." *Hepatology* **50**(3): 799-807.
- Hoeve, M. A., de Boer, T., Langenberg, D. M., Sanal, O., Verreck, F. A. and Ottenhoff, T. H. (2003). "IL-12 receptor deficiency revisited: IL-23-mediated signaling is also impaired in human genetic IL-12 receptor beta1 deficiency." *Eur J Immunol* **33**(12): 3393-7.
- Holmes, M. D., Pollak, M. N. and Hankinson, S. E. (2002). "Lifestyle correlates of plasma insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor binding protein 3 concentrations." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**(9): 862-7.
- Horng, T., Bezbradica, J. S. and Medzhitov, R. (2007). "NKG2D signaling is coupled to the interleukin 15 receptor signaling pathway." *Nat Immunol* **8**(12): 1345-52.
- Hoshino, T., Wiltout, R. H. and Young, H. A. (1999). "IL-18 is a potent coinducer of IL-13 in NK and T cells: a new potential role for IL-18 in modulating the immune response." *J Immunol* **162**(9): 5070-7.
- Houchins, J. P., Yabe, T., McSherry, C. and Bach, F. H. (1991). "DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells." *J Exp Med* **173**(4): 1017-20.
- Houchins, J. P., Lanier, L. L., Niemi, E. C., Phillips, J. H. and Ryan, J. C. (1997). "Natural killer cell cytolytic activity is inhibited by NKG2-A and activated by NKG2-C." *J Immunol* **158**(8): 3603-9.
- Howard, J. K., Lord, G. M., Matarese, G., Vendetti, S., Ghatei, M. A., Ritter, M. A., Lechler, R. I. and Bloom, S. R. (1999). "Leptin protects mice from starvation-induced lymphoid atrophy and increases thymic cellularity in ob/ob mice." *J Clin Invest* **104**(8): 1051-9.
- Hsu, K. C., Liu, X. R., Selvakumar, A., Mickelson, E., O'Reilly, R. J. and Dupont, B. (2002). "Killer Ig-like receptor haplotype analysis by gene content: evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets." *J Immunol* **169**(9): 5118-29.
- Hu, D. E., Dyke, S. O., Moore, A. M., Thomsen, L. L. and Brindle, K. M. (2004). "Tumor cell-derived nitric oxide is involved in the immune-rejection of an immunogenic murine lymphoma." *Cancer Res* **64**(1): 152-61.
- Huang, S., Ullrich, S. E. and Bar-Eli, M. (1999). "Regulation of tumor growth and metastasis by interleukin-10: the melanoma experience." *J Interferon Cytokine Res* **19**(7): 697-703.
- Huang, S., Van Arsdall, M., Tedjarati, S., McCarty, M., Wu, W., Langley, R. and Fidler, I. J. (2002). "Contributions of stromal metalloproteinase-9 to angiogenesis and growth of human ovarian carcinoma in mice." *J Natl Cancer Inst* **94**(15): 1134-42.
- Hubert, P., Jacobs, N., Caberg, J. H., Boniver, J. and Delvenne, P. (2007). "The cross-talk between dendritic and regulatory T cells: good or evil?" *J Leukoc Biol* **82**(4): 781-94.
- Hughes, D. A., Pinder, A. C., Piper, Z., Johnson, I. T. and Lund, E. K. (1996). "Fish oil supplementation inhibits the expression of major histocompatibility complex class II molecules and adhesion molecules on human monocytes." *Am J Clin Nutr* **63**(2): 267-72.
- Hughes, T., Becknell, B., McClory, S., Briercheck, E., Freud, A. G., Zhang, X., Mao, H., Nuovo, G., Yu, J. and Caligiuri, M. A. (2009). "Stage 3 immature human natural killer cells found in secondary lymphoid tissue constitutively and selectively express the TH 17 cytokine interleukin-22." *Blood* **113**(17): 4008-10.
- Hughes, T., Becknell, B., Freud, A. G., McClory, S., Briercheck, E., Yu, J., Mao, C., Giovenzana, C., Nuovo, G., Wei, L., Zhang, X., Gavrilin, M. A., Wewers, M. D. and Caligiuri, M. A. (2010). "Interleukin-1beta selectively expands and sustains interleukin-22+ immature human natural killer cells in secondary lymphoid tissue." *Immunity* **32**(6): 803-14.
- Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D. and Levitsky, H. (1998). "The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response." *J Exp Med* **188**(12): 2357-68.
- Huntington, N. D., Legrand, N., Alves, N. L., Jaron, B., Weijer, K., Plet, A., Corcuff, E., Mortier, E., Jacques, Y., Spits, H. and Di Santo, J. P. (2009). "IL-15 trans-presentation promotes human NK cell development and differentiation in vivo." *J Exp Med* **206**(1): 25-34.

- Hursting, S. D., Lavigne, J. A., Berrigan, D., Perkins, S. N. and Barrett, J. C. (2003). "Calorie restriction, aging, and cancer prevention: mechanisms of action and applicability to humans." *Annu Rev Med* **54**: 131-52.
 - Hursting, S. D. and Berger, N. A. (2010). "Energy balance, host-related factors, and cancer progression." *J Clin Oncol* **28**(26): 4058-65.
 - Hussain, S. P., Hofseth, L. J. and Harris, C. C. (2003). "Radical causes of cancer." *Nat Rev Cancer* **3**(4): 276-85.
 - Hussain, S. P., Trivers, G. E., Hofseth, L. J., He, P., Shaikh, I., Mechanic, L. E., Doja, S., Jiang, W., Subleski, J., Shorts, L., Haines, D., Laubach, V. E., Wiltout, R. H., Djurickovic, D. and Harris, C. C. (2004). "Nitric oxide, a mediator of inflammation, suppresses tumorigenesis." *Cancer Res* **64**(19): 6849-53.
- I-
- Ibiza, S., Victor, V. M., Bosca, I., Ortega, A., Urzainqui, A., O'Connor, J. E., Sanchez-Madrid, F., Esplugues, J. V. and Serrador, J. M. (2006). "Endothelial nitric oxide synthase regulates T cell receptor signaling at the immunological synapse." *Immunity* **24**(6): 753-65.
 - Ichinoe, M., Mikami, T., Shiraishi, H. and Okayasu, I. (2004). "High microvascular density is correlated with high VEGF, iNOS and COX-2 expression in penetrating growth-type early gastric carcinomas." *Histopathology* **45**(6): 612-8.
 - Ikeda, H., Old, L. J. and Schreiber, R. D. (2002). "The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting." *Cytokine Growth Factor Rev* **13**(2): 95-109.
 - Ilani, T., Khanna, C., Zhou, M., Veenstra, T. D. and Bretscher, A. (2007). "Immune synapse formation requires ZAP-70 recruitment by ezrin and CD43 removal by moesin." *J Cell Biol* **179**(4): 733-46.
 - Inngjerdingen, M., Damaj, B. and Maghazachi, A. A. (2000). "Human NK cells express CC chemokine receptors 4 and 8 and respond to thymus and activation-regulated chemokine, macrophage-derived chemokine, and I-309." *J Immunol* **164**(8): 4048-54.
 - Inngjerdingen, M., Damaj, B. and Maghazachi, A. A. (2001). "Expression and regulation of chemokine receptors in human natural killer cells." *Blood* **97**(2): 367-75.
 - Ino, K., Yoshida, N., Kajiyama, H., Shibata, K., Yamamoto, E., Kidokoro, K., Takahashi, N., Terauchi, M., Nawa, A., Nomura, S., Nagasaka, T., Takikawa, O. and Kikkawa, F. (2006). "Indoleamine 2,3-dioxygenase is a novel prognostic indicator for endometrial cancer." *Br J Cancer* **95**(11): 1555-61.
 - Inoue, H., Takamori, M., Shimoyama, Y., Ishibashi, H., Yamamoto, S. and Koshihara, Y. (2002). "Regulation by PGE2 of the production of interleukin-6, macrophage colony stimulating factor, and vascular endothelial growth factor in human synovial fibroblasts." *Br J Pharmacol* **136**(2): 287-95.
 - Irmeler, M., Hertig, S., MacDonald, H. R., Sadoul, R., Becherer, J. D., Proudfoot, A., Solari, R. and Tschopp, J. (1995). "Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme." *J Exp Med* **181**(5): 1917-22.
 - Ishii, Y., Ogura, T., Tatemichi, M., Fujisawa, H., Otsuka, F. and Esumi, H. (2003). "Induction of matrix metalloproteinase gene transcription by nitric oxide and mechanisms of MMP-1 gene induction in human melanoma cell lines." *Int J Cancer* **103**(2): 161-8.
 - Ito, M., Watanabe, M., Kamiya, H. and Sakurai, M. (1996). "Inhibition of natural killer cell activity against cytomegalovirus-infected fibroblasts by nitric oxide-releasing agents." *Cell Immunol* **174**(1): 13-8.
 - Iwakura, Y., Nakae, S., Saijo, S. and Ishigame, H. (2008). "The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens." *Immunol Rev* **226**: 57-79.
- J-
- Jackson, J. G., White, M. F. and Yee, D. (1998). "Insulin receptor substrate-1 is the predominant signaling molecule activated by insulin-like growth factor-I, insulin, and interleukin-4 in estrogen receptor-positive human breast cancer cells." *J Biol Chem* **273**(16): 9994-10003.
 - Jackson, J. G., Zhang, X., Yoneda, T. and Yee, D. (2001). "Regulation of breast cancer cell motility by insulin receptor substrate-2 (IRS-2) in metastatic variants of human breast cancer cell lines." *Oncogene* **20**(50): 7318-25.
 - Jacobs, R., Hintzen, G., Kemper, A., Beul, K., Kempf, S., Behrens, G., Sykora, K. W. and Schmidt, R. E. (2001). "CD56bright cells differ in their KIR repertoire and cytotoxic features from CD56dim NK cells." *Eur J Immunol* **31**(10): 3121-7.
 - Jahn, R., Lang, T. and Sudhof, T. C. (2003). "Membrane fusion." *Cell* **112**(4): 519-33.
 - Jameson, S. C. (2002). "Maintaining the norm: T-cell homeostasis." *Nat Rev Immunol* **2**(8): 547-56.
 - Jang, J. Y., Jeon, Y. K., Choi, Y. and Kim, C. W. (2010). "Short-hairpin RNA-induced suppression of adenine nucleotide translocase-2 in breast cancer cells restores their susceptibility to TRAIL-induced apoptosis by activating JNK and modulating TRAIL receptor expression." *Mol Cancer* **9**: 262.
 - Janikashvili, N., Bonnotte, B., Katsanis, E. and Larmonier, N. (2011). "The dendritic cell-regulatory T lymphocyte crosstalk contributes to tumor-induced tolerance." *Clin Dev Immunol* **2011**: 430394.
 - Jarde, T., Caldefie-Chezet, F., Damez, M., Mishellany, F., Penault-Llorca, F., Guillot, J. and Vasson, M. P. (2008a). "Leptin and leptin receptor involvement in cancer development: a study on human primary breast carcinoma." *Oncol Rep* **19**(4): 905-11.

- Jarde, T., Caldefie-Chezet, F., Damez, M., Mishellany, F., Perrone, D., Penault-Llorca, F., Guillot, J. and Vasson, M. P. (2008b). "Adiponectin and leptin expression in primary ductal breast cancer and in adjacent healthy epithelial and myoepithelial tissue." *Histopathology* **53**(4): 484-7.
- Jarde, T., Caldefie-Chezet, F., Goncalves-Mendes, N., Mishellany, F., Buechler, C., Penault-Llorca, F. and Vasson, M. P. (2009). "Involvement of adiponectin and leptin in breast cancer: clinical and in vitro studies." *Endocr Relat Cancer* **16**(4): 1197-210.
- Jarde, T., Perrier, S., Vasson, M. P. and Caldefie-Chezet, F. (2011). "Molecular mechanisms of leptin and adiponectin in breast cancer." *Eur J Cancer* **47**(1): 33-43.
- Jeffery, N. M., Cortina, M., Newsholme, E. A. and Calder, P. C. (1997). "Effects of variations in the proportions of saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids in the rat diet on spleen lymphocyte functions." *Br J Nutr* **77**(5): 805-23.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. and Ward, E. (2010). "Cancer statistics, 2010." *CA Cancer J Clin* **60**(5): 277-300.
- Jensen, P. E. (2007). "Recent advances in antigen processing and presentation." *Nat Immunol* **8**(10): 1041-8.
- Jiang, C., Ting, A. T. and Seed, B. (1998). "PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines." *Nature* **391**(6662): 82-6.
- Johansson, S., Johansson, M., Rosmaraki, E., Vahlne, G., Mehr, R., Salmon-Divon, M., Lemonnier, F., Karre, K. and Hoglund, P. (2005). "Natural killer cell education in mice with single or multiple major histocompatibility complex class I molecules." *J Exp Med* **201**(7): 1145-55.
- Joncker, N. T. and Raulet, D. H. (2008). "Regulation of NK cell responsiveness to achieve self-tolerance and maximal responses to diseased target cells." *Immunol Rev* **224**: 85-97.
- Joncker, N. T., Fernandez, N. C., Treiner, E., Vivier, E. and Raulet, D. H. (2009). "NK cell responsiveness is tuned commensurate with the number of inhibitory receptors for self-MHC class I: the rheostat model." *J Immunol* **182**(8): 4572-80.
- Jones, D. C., Manning, B. M. and Daynes, R. A. (2002). "A role for the peroxisome proliferator-activated receptor alpha in T-cell physiology and ageing immunobiology." *Proc Nutr Soc* **61**(3): 363-9.
- Jonsson, A. H. and Yokoyama, W. M. (2009). "Natural killer cell tolerance licensing and other mechanisms." *Adv Immunol* **101**: 27-79.
- Jyothi, M. D. and Khar, A. (1999). "Induction of nitric oxide production by natural killer cells: its role in tumor cell death." *Nitric Oxide* **3**(5): 409-18.
- K-
- Kaaks, R., Rinaldi, S., Key, T. J., Berrino, F., Peeters, P. H., Biessy, C., Dossus, L., Lukanova, A., Bingham, S., Khaw, K. T., Allen, N. E., Bueno-de-Mesquita, H. B., van Gils, C. H., Grobbee, D., Boeing, H., Lahmann, P. H., Nagel, G., Chang-Claude, J., Clavel-Chapelon, F., Fournier, A., Thiebaut, A., Gonzalez, C. A., Quiros, J. R., Tormo, M. J., Ardanaz, E., Amiano, P., Krogh, V., Palli, D., Panico, S., Tumino, R., Vineis, P., Trichopoulou, A., Kalapothaki, V., Trichopoulos, D., Ferrari, P., Norat, T., Saracci, R. and Riboli, E. (2005). "Postmenopausal serum androgens, oestrogens and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition." *Endocr Relat Cancer* **12**(4): 1071-82.
- Kacinski, B. M. (1995). "CSF-1 and its receptor in ovarian, endometrial and breast cancer." *Ann Med* **27**(1): 79-85.
- Kaech, S. M., Wherry, E. J. and Ahmed, R. (2002). "Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development." *Nat Rev Immunol* **2**(4): 251-62.
- Kaech, S. M. and Ahmed, R. (2003). "Immunology. CD8 T cells remember with a little help." *Science* **300**(5617): 263-5.
- Kaiser, B. K., Yim, D., Chow, I. T., Gonzalez, S., Dai, Z., Mann, H. H., Strong, R. K., Groh, V. and Spies, T. (2007). "Disulphide-isomerase-enabled shedding of tumour-associated NKG2D ligands." *Nature* **447**(7143): 482-6.
- Kaiser, B. K., Pizarro, J. C., Kerns, J. and Strong, R. K. (2008). "Structural basis for NKG2A/CD94 recognition of HLA-E." *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(18): 6696-701.
- Kanda, T., Takahashi, T., Kudo, S., Takeda, T., Tsugawa, H. and Takekoshi, N. (2004). "Leptin deficiency enhances myocardial necrosis and lethality in a murine model of viral myocarditis." *Life Sci* **75**(12): 1435-47.
- Kang, K. S., Wang, P., Yamabe, N., Fukui, M., Jay, T. and Zhu, B. T. (2010). "Docosahexaenoic acid induces apoptosis in MCF-7 cells in vitro and in vivo via reactive oxygen species formation and caspase 8 activation." *PLoS One* **5**(4): e10296.
- Karlsson, E. A. and Beck, M. A. (2010). "The burden of obesity on infectious disease." *Exp Biol Med* (Maywood) **235**(12): 1412-24.
- Kasaian, M. T., Whitters, M. J., Carter, L. L., Lowe, L. D., Jussif, J. M., Deng, B., Johnson, K. A., Witek, J. S., Senices, M., Konz, R. F., Wurster, A. L., Donaldson, D. D., Collins, M., Young, D. A. and Grusby, M.

- J. (2002). "IL-21 limits NK cell responses and promotes antigen-specific T cell activation: a mediator of the transition from innate to adaptive immunity." *Immunity* **16**(4): 559-69.
- Kaspar, A. A., Okada, S., Kumar, J., Poulain, F. R., Drouvalakis, K. A., Kelekar, A., Hanson, D. A., Kluck, R. M., Hitoshi, Y., Johnson, D. E., Froelich, C. J., Thompson, C. B., Newmeyer, D. D., Anel, A., Clayberger, C. and Krensky, A. M. (2001). "A distinct pathway of cell-mediated apoptosis initiated by granulysin." *J Immunol* **167**(1): 350-6.
- Kasuno, K., Takabuchi, S., Fukuda, K., Kizaka-Kondoh, S., Yodoi, J., Adachi, T., Semenza, G. L. and Hirota, K. (2004). "Nitric oxide induces hypoxia-inducible factor 1 activation that is dependent on MAPK and phosphatidylinositol 3-kinase signaling." *J Biol Chem* **279**(4): 2550-8.
- Katagiri, Y. U., Kiyokawa, N. and Fujimoto, J. (2001). "A role for lipid rafts in immune cell signaling." *Microbiol Immunol* **45**(1): 1-8.
- Kato, J. Y. (1997). "Control of G1 progression by D-type cyclins: key event for cell proliferation." *Leukemia* **11 Suppl 3**: 347-51.
- Kattan, Z., Minig, V., Leroy, P., Dauca, M. and Becuwe, P. (2008). "Role of manganese superoxide dismutase on growth and invasive properties of human estrogen-independent breast cancer cells." *Breast Cancer Res Treat* **108**(2): 203-15.
- Kaufmann, S. H., Blum, C. and Yamamoto, S. (1993). "Crosstalk between alpha/beta T cells and gamma/delta T cells in vivo: activation of alpha/beta T-cell responses after gamma/delta T-cell modulation with the monoclonal antibody GL3." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(20): 9620-4.
- Keefe, D., Shi, L., Feske, S., Massol, R., Navarro, F., Kirchhausen, T. and Lieberman, J. (2005). "Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis." *Immunity* **23**(3): 249-62.
- Kelley, D. S., Taylor, P. C., Nelson, G. J., Schmidt, P. C., Ferretti, A., Erickson, K. L., Yu, R., Chandra, R. K. and Mackey, B. E. (1999). "Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men." *Lipids* **34**(4): 317-24.
- Kelly, J. M., Waterhouse, N. J., Cretney, E., Browne, K. A., Ellis, S., Trapani, J. A. and Smyth, M. J. (2004). "Granzyme M mediates a novel form of perforin-dependent cell death." *J Biol Chem* **279**(21): 22236-42.
- Kennedy, M. K., Glaccum, M., Brown, S. N., Butz, E. A., Viney, J. L., Embers, M., Matsuki, N., Charrier, K., Sedger, L., Willis, C. R., Brasel, K., Morrissey, P. J., Stocking, K., Schuh, J. C., Joyce, S. and Peschon, J. J. (2000). "Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice." *J Exp Med* **191**(5): 771-80.
- Kersh, G. J., Kersh, E. N., Fremont, D. H. and Allen, P. M. (1998). "High- and low-potency ligands with similar affinities for the TCR: the importance of kinetics in TCR signaling." *Immunity* **9**(6): 817-26.
- Keskin, D. B., Allan, D. S., Rybalov, B., Andzelm, M. M., Stern, J. N., Kopcow, H. D., Koopman, L. A. and Strominger, J. L. (2007). "TGFbeta promotes conversion of CD16+ peripheral blood NK cells into CD16- NK cells with similarities to decidual NK cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(9): 3378-83.
- Key, T. J., Appleby, P. N., Reeves, G. K., Roddam, A., Dorgan, J. F., Longcope, C., Stanczyk, F. Z., Stephenson, H. E., Jr., Falk, R. T., Miller, R., Schatzkin, A., Allen, D. S., Fentiman, I. S., Wang, D. Y., Dowsett, M., Thomas, H. V., Hankinson, S. E., Toniolo, P., Akhmedkhanov, A., Koenig, K., Shore, R. E., Zeleniuch-Jacquotte, A., Berrino, F., Muti, P., Micheli, A., Krogh, V., Sieri, S., Pala, V., Venturelli, E., Secreto, G., Barrett-Connor, E., Laughlin, G. A., Kabuto, M., Akiba, S., Stevens, R. G., Neriishi, K., Land, C. E., Cauley, J. A., Kuller, L. H., Cummings, S. R., Helzlsouer, K. J., Alberg, A. J., Bush, T. L., Comstock, G. W., Gordon, G. B. and Miller, S. R. (2003). "Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women." *J Natl Cancer Inst* **95**(16): 1218-26.
- Khakoo, S. I., Geller, R., Shin, S., Jenkins, J. A. and Parham, P. (2002). "The D0 domain of KIR3D acts as a major histocompatibility complex class I binding enhancer." *J Exp Med* **196**(7): 911-21.
- Khong, H. T. and Restifo, N. P. (2002). "Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes." *Nat Immunol* **3**(11): 999-1005.
- Kiguchi, N., Maeda, T., Kobayashi, Y., Fukazawa, Y. and Kishioka, S. (2009). "Leptin enhances CC-chemokine ligand expression in cultured murine macrophage." *Biochem Biophys Res Commun* **384**(3): 311-5.
- Kikuchi-Maki, A., Catina, T. L. and Campbell, K. S. (2005). "Cutting edge: KIR2DL4 transduces signals into human NK cells through association with the Fc receptor gamma protein." *J Immunol* **174**(7): 3859-63.
- Kim, E. J., Choi, M. R., Park, H., Kim, M., Hong, J. E., Lee, J. Y., Chun, H. S., Lee, K. W. and Yoon Park, J. H. (2011). "Dietary fat increases solid tumor growth and metastasis of 4T1 murine mammary carcinoma cells and mortality in obesity-resistant BALB/c mice." *Breast Cancer Res* **13**(4): R78.
- Kim, J. M., Rasmussen, J. P. and Rudensky, A. Y. (2007). "Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice." *Nat Immunol* **8**(2): 191-7.

- Kim, J. S., Choi, S. E., Yun, I. H., Kim, J. Y., Ahn, C., Kim, S. J., Ha, J., Hwang, E. S., Cha, C. Y., Miyagawa, S. and Park, C. G. (2004). "Human cytomegalovirus UL18 alleviated human NK-mediated swine endothelial cell lysis." *Biochem Biophys Res Commun* **315**(1): 144-50.
- Kim, K. E., Song, H., Kim, T. S., Yoon, D., Kim, C. W., Bang, S. I., Hur, D. Y., Park, H. and Cho, D. H. (2007). "Interleukin-18 is a critical factor for vascular endothelial growth factor-enhanced migration in human gastric cancer cell lines." *Oncogene* **26**(10): 1468-76.
- Kim, K. Y., Kang, M. A. and Nam, M. J. (2001). "Enhancement of natural killer cell-mediated cytotoxicity by coexpression of GM-CSF/B70 in hepatoma." *Cancer Lett* **166**(1): 33-40.
- Kim, M. J., Kim, H. B., Bae, J. H., Lee, J. W., Park, S. J., Kim, D. W., Park, S. I., Kang, C. D. and Kim, S. H. (2009). "Sensitization of human K562 leukemic cells to TRAIL-induced apoptosis by inhibiting the DNA-PKcs/Akt-mediated cell survival pathway." *Biochem Pharmacol* **78**(6): 573-82.
- Kimata, H. and Fujimoto, M. (1994). "Growth hormone and insulin-like growth factor I induce immunoglobulin (Ig)E and IgG4 production by human B cells." *J Exp Med* **180**(2): 727-32.
- Kimball, S. R. (2001). "Regulation of translation initiation by amino acids in eukaryotic cells." *Prog Mol Subcell Biol* **26**: 155-84.
- Kimura, H., Weisz, A., Kurashima, Y., Hashimoto, K., Ogura, T., D'Acquisto, F., Addeo, R., Makuuchi, M. and Esumi, H. (2000). "Hypoxia response element of the human vascular endothelial growth factor gene mediates transcriptional regulation by nitric oxide: control of hypoxia-inducible factor-1 activity by nitric oxide." *Blood* **95**(1): 189-97.
- King, A., Loke, Y. W. and Chaouat, G. (1997). "NK cells and reproduction." *Immunol Today* **18**(2): 64-6.
- Kirschenbaum, A., Liotta, D. R., Yao, S., Liu, X. H., Klausner, A. P., Unger, P., Shapiro, E., Leav, I. and Levine, A. C. (2000). "Immunohistochemical localization of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in the human fetal and adult male reproductive tracts." *J Clin Endocrinol Metab* **85**(9): 3436-41.
- Klein, G. (1973). "Immunological surveillance against neoplasia." *Harvey Lect*(69): 71-102.
- Kleinfeld, A. M. and Okada, C. (2005). "Free fatty acid release from human breast cancer tissue inhibits cytotoxic T-lymphocyte-mediated killing." *J Lipid Res* **46**(9): 1983-90.
- Kliwer, S. A., Sundseth, S. S., Jones, S. A., Brown, P. J., Wisely, G. B., Koble, C. S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T. M., Lenhard, J. M. and Lehmann, J. M. (1997). "Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(9): 4318-23.
- Klimp, A. H., de Vries, E. G., Scherphof, G. L. and Daemen, T. (2002). "A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer." *Crit Rev Oncol Hematol* **44**(2): 143-61.
- Knutson, K. L. and Disis, M. L. (2005). "Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy." *Cancer Immunol Immunother* **54**(8): 721-8.
- Kobayashi, H., Dubois, S., Sato, N., Sabzevari, H., Sakai, Y., Waldmann, T. A. and Tagaya, Y. (2005). "Role of trans-cellular IL-15 presentation in the activation of NK cell-mediated killing, which leads to enhanced tumor immunosurveillance." *Blood* **105**(2): 721-7.
- Kohler, B. A., Ward, E., McCarthy, B. J., Schymura, M. J., Ries, L. A., Ehemann, C., Jemal, A., Anderson, R. N., Ajani, U. A. and Edwards, B. K. (2011). "Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2007, featuring tumors of the brain and other nervous system." *J Natl Cancer Inst* **103**(9): 714-36.
- Kohno, T., Mizukami, H., Suzuki, M., Saga, Y., Takei, Y., Shimpo, M., Matsushita, T., Okada, T., Hanazono, Y., Kume, A., Sato, I. and Ozawa, K. (2003). "Interleukin-10-mediated inhibition of angiogenesis and tumor growth in mice bearing VEGF-producing ovarian cancer." *Cancer Res* **63**(16): 5091-4.
- Koka, R., Burkett, P. R., Chien, M., Chai, S., Chan, F., Lodolce, J. P., Boone, D. L. and Ma, A. (2003). "Interleukin (IL)-15[alpha]-deficient natural killer cells survive in normal but not IL-15[alpha]-deficient mice." *J Exp Med* **197**(8): 977-84.
- Kondo, M., Weissman, I. L. and Akashi, K. (1997). "Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow." *Cell* **91**(5): 661-72.
- Kooijman, R., Willems, M., De Haas, C. J., Rijkers, G. T., Schuurmans, A. L., Van Buul-Offers, S. C., Heijnen, C. J. and Zegers, B. J. (1992). "Expression of type I insulin-like growth factor receptors on human peripheral blood mononuclear cells." *Endocrinology* **131**(5): 2244-50.
- Kooijman, R., Coppens, A. and Hooghe-Peters, E. (2002). "Igf-I inhibits spontaneous apoptosis in human granulocytes." *Endocrinology* **143**(4): 1206-12.
- Kooijman, R. and Coppens, A. (2004). "Insulin-like growth factor-I stimulates IL-10 production in human T cells." *J Leukoc Biol* **76**(4): 862-7.
- Kooijman, R. (2006). "Regulation of apoptosis by insulin-like growth factor (IGF)-I." *Cytokine Growth Factor Rev* **17**(4): 305-23.

- Koopman, L. A., Kopcow, H. D., Rybalov, B., Boyson, J. E., Orange, J. S., Schatz, F., Masch, R., Lockwood, C. J., Schachter, A. D., Park, P. J. and Strominger, J. L. (2003). "Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential." *J Exp Med* **198**(8): 1201-12.
 - Kopp, H. G., Placke, T. and Salih, H. R. (2009). "Platelet-derived transforming growth factor-beta down-regulates NKG2D thereby inhibiting natural killer cell antitumor reactivity." *Cancer Res* **69**(19): 7775-83.
 - Korbel, D. S., Norman, P. J., Newman, K. C., Horowitz, A., Gendzekhadze, K., Parham, P. and Riley, E. M. (2009). "Killer Ig-like receptor (KIR) genotype predicts the capacity of human KIR-positive CD56dim NK cells to respond to pathogen-associated signals." *J Immunol* **182**(10): 6426-34.
 - Kotamraju, S., Williams, C. L. and Kalyanaraman, B. (2007). "Statin-induced breast cancer cell death: role of inducible nitric oxide and arginase-dependent pathways." *Cancer Res* **67**(15): 7386-94.
 - Koyama, S., Koike, N. and Adachi, S. (2001). "Fas receptor counterattack against tumor-infiltrating lymphocytes in vivo as a mechanism of immune escape in gastric carcinoma." *J Cancer Res Clin Oncol* **127**(1): 20-6.
 - Krammer, P. H., Arnold, R. and Lavrik, I. N. (2007). "Life and death in peripheral T cells." *Nat Rev Immunol* **7**(7): 532-42.
 - Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M. C. and von Boehmer, H. (2005). "Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen." *Nat Immunol* **6**(12): 1219-27.
 - Kubagawa, H., Burrows, P. D. and Cooper, M. D. (1997). "A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 5261-6.
 - Kuchel, J. M., Barnetson, R. S. and Halliday, G. M. (2003). "Nitric oxide appears to be a mediator of solar-simulated ultraviolet radiation-induced immunosuppression in humans." *J Invest Dermatol* **121**(3): 587-93.
 - Kulkarni, S., Martin, M. P. and Carrington, M. (2008). "The Yin and Yang of HLA and KIR in human disease." *Semin Immunol* **20**(6): 343-52.
 - Kumar, V. and McNerney, M. E. (2005). "A new self: MHC-class-I-independent natural-killer-cell self-tolerance." *Nat Rev Immunol* **5**(5): 363-74.
 - Kundu, N. and Fulton, A. M. (1997). "Interleukin-10 inhibits tumor metastasis, downregulates MHC class I, and enhances NK lysis." *Cell Immunol* **180**(1): 55-61.
 - Kunikata, T., Torigoe, K., Ushio, S., Okura, T., Ushio, C., Yamauchi, H., Ikeda, M., Ikegami, H. and Kurimoto, M. (1998). "Constitutive and induced IL-18 receptor expression by various peripheral blood cell subsets as determined by anti-hIL-18R monoclonal antibody." *Cell Immunol* **189**(2): 135-43.
 - Kupfer, A. and Dennert, G. (1984). "Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells." *J Immunol* **133**(5): 2762-6.
 - Kushner, P. J., Agard, D. A., Greene, G. L., Scanlan, T. S., Shiau, A. K., Uht, R. M. and Webb, P. (2000). "Estrogen receptor pathways to AP-1." *J Steroid Biochem Mol Biol* **74**(5): 311-7.
 - Kusmartsev, S., Nefedova, Y., Yoder, D. and Gabrilovich, D. I. (2004). "Antigen-specific inhibition of CD8+ T cell response by immature myeloid cells in cancer is mediated by reactive oxygen species." *J Immunol* **172**(2): 989-99.
 - Kusmartsev, S., Nagaraj, S. and Gabrilovich, D. I. (2005). "Tumor-associated CD8+ T cell tolerance induced by bone marrow-derived immature myeloid cells." *J Immunol* **175**(7): 4583-92.
 - Kwak, B. R., Myit, S., Mulhaupt, F., Veillard, N., Rufer, N., Roosnek, E. and Mach, F. (2002). "PPARgamma but not PPARalpha ligands are potent repressors of major histocompatibility complex class II induction in atheroma-associated cells." *Circ Res* **90**(3): 356-62.
 - Kwidzinski, E., Bunse, J., Aktas, O., Richter, D., Mutlu, L., Zipp, F., Nitsch, R. and Bechmann, I. (2005). "Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation." *FASEB J* **19**(10): 1347-9.
- L-
- La Cava, A. and Matarese, G. (2004). "The weight of leptin in immunity." *Nat Rev Immunol* **4**(5): 371-9.
 - Lakshmikanth, T., Burke, S., Ali, T. H., Kimpfler, S., Ursini, F., Ruggeri, L., Capanni, M., Umanaky, V., Paschen, A., Sucker, A., Pende, D., Groh, V., Biassoni, R., Hoglund, P., Kato, M., Shibuya, K., Schadendorf, D., Anichini, A., Ferrone, S., Velardi, A., Karre, K., Shibuya, A., Carbone, E. and Colucci, F. (2009). "NCRs and DNAM-1 mediate NK cell recognition and lysis of human and mouse melanoma cell lines in vitro and in vivo." *J Clin Invest* **119**(5): 1251-63.
 - Lamas, O., Marti, A. and Martinez, J. A. (2002). "Obesity and immunocompetence." *Eur J Clin Nutr* **56 Suppl 3**: S42-5.
 - Lammert, A., Kiess, W., Bottner, A., Glasow, A. and Kratzsch, J. (2001). "Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood." *Biochem Biophys Res Commun* **283**(4): 982-8.

- Langrish, C. L., Chen, Y., Blumenschein, W. M., Mattson, J., Basham, B., Sedgwick, J. D., McClanahan, T., Kastelein, R. A. and Cua, D. J. (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." *J Exp Med* **201**(2): 233-40.
- Lanier, L. L., Le, A. M., Civin, C. I., Loken, M. R. and Phillips, J. H. (1986). "The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes." *J Immunol* **136**(12): 4480-6.
- Lanier, L. L., Testi, R., Bindl, J. and Phillips, J. H. (1989). "Identity of Leu-19 (CD56) leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule." *J Exp Med* **169**(6): 2233-8.
- Lanier, L. L., Yu, G. and Phillips, J. H. (1991). "Analysis of Fc gamma RIII (CD16) membrane expression and association with CD3 zeta and Fc epsilon RI-gamma by site-directed mutation." *J Immunol* **146**(5): 1571-6.
- Lanier, L. L., Corliss, B., Wu, J. and Phillips, J. H. (1998). "Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors." *Immunity* **8**(6): 693-701.
- Lanier, L. L. (2005). "NK cell recognition." *Annu Rev Immunol* **23**: 225-74.
- Lanier, L. L. (2008). "Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition." *Nat Immunol* **9**(5): 495-502.
- Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2001). "Regulation of T cell immunity by dendritic cells." *Cell* **106**(3): 263-6.
- Laouar, Y., Sutterwala, F. S., Gorelik, L. and Flavell, R. A. (2005). "Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma." *Nat Immunol* **6**(6): 600-7.
- Latinovic-Golic, S., Walch, M., Sundstrom, H., Dumrese, C., Groscurth, P. and Ziegler, U. (2007). "Expression, processing and transcriptional regulation of granzyme in short-term activated human lymphocytes." *BMC Immunol* **8**: 9.
- Lautenbach, A., Wrann, C. D., Jacobs, R., Muller, G., Brabant, G. and Nave, H. (2009). "Altered phenotype of NK cells from obese rats can be normalized by transfer into lean animals." *Obesity (Silver Spring)* **17**(10): 1848-55.
- Lazennec, G., Bresson, D., Lucas, A., Chauveau, C. and Vignon, F. (2001). "ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells." *Endocrinology* **142**(9): 4120-30.
- Lazetic, S., Chang, C., Houchins, J. P., Lanier, L. L. and Phillips, J. H. (1996). "Human natural killer cell receptors involved in MHC class I recognition are disulfide-linked heterodimers of CD94 and NKG2 subunits." *J Immunol* **157**(11): 4741-5.
- Le Drian, E., Vely, F., Olcese, L., Cambiaggi, A., Guia, S., Krystal, G., Gervois, N., Moretta, A., Jotereau, F. and Vivier, E. (1998). "Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases." *Eur J Immunol* **28**(1): 264-76.
- Le Gal, F. A., Riteau, B., Sedlik, C., Khalil-Daher, I., Menier, C., Dausset, J., Guillet, J. G., Carosella, E. D. and Rouas-Freiss, N. (1999). "HLA-G-mediated inhibition of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes." *Int Immunol* **11**(8): 1351-6.
- Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S., Renoir, J. M. and Corbo, L. (2011). "Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors." *Endocr Rev* **32**(5): 597-622.
- Lee, G. K., Park, H. J., Macleod, M., Chandler, P., Munn, D. H. and Mellor, A. L. (2002). "Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division." *Immunology* **107**(4): 452-60.
- Lee, H. W., Park, S. J., Choi, B. K., Kim, H. H., Nam, K. O. and Kwon, B. S. (2002). "4-1BB promotes the survival of CD8+ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1." *J Immunol* **169**(9): 4882-8.
- Lee, J. C., Lee, K. M., Kim, D. W. and Heo, D. S. (2004). "Elevated TGF-beta1 secretion and down-modulation of NKG2D underlies impaired NK cytotoxicity in cancer patients." *J Immunol* **172**(12): 7335-40.
- Lee, J. H., Torisu-Itakara, H., Cochran, A. J., Kadison, A., Huynh, Y., Morton, D. L. and Essner, R. (2005). "Quantitative analysis of melanoma-induced cytokine-mediated immunosuppression in melanoma sentinel nodes." *Clin Cancer Res* **11**(1): 107-12.
- Lee, J. R., Dalton, R. R., Messina, J. L., Sharma, M. D., Smith, D. M., Burgess, R. E., Mazzella, F., Antonia, S. J., Mellor, A. L. and Munn, D. H. (2003). "Pattern of recruitment of immunoregulatory antigen-presenting cells in malignant melanoma." *Lab Invest* **83**(10): 1457-66.
- Lee, N., Goodlett, D. R., Ishitani, A., Marquardt, H. and Geraghty, D. E. (1998). "HLA-E surface expression depends on binding of TAP-dependent peptides derived from certain HLA class I signal sequences." *J Immunol* **160**(10): 4951-60.
- Leek, R. D., Lewis, C. E., Whitehouse, R., Greenall, M., Clarke, J. and Harris, A. L. (1996). "Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma." *Cancer Res* **56**(20): 4625-9.

- Leek, R. D., Landers, R. J., Harris, A. L. and Lewis, C. E. (1999). "Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast." *Br J Cancer* **79**(5-6): 991-5.
- Lefebvre, S., Antoine, M., Uzan, S., McMaster, M., Dausset, J., Carosella, E. D. and Paul, P. (2002). "Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer." *J Pathol* **196**(3): 266-74.
- Lefrancois, L. (2006). "Development, trafficking, and function of memory T-cell subsets." *Immunol Rev* **211**: 93-103.
- Leite-De-Moraes, M. C., Hameg, A., Pacilio, M., Koezuka, Y., Taniguchi, M., Van Kaer, L., Schneider, E., Dy, M. and Herbelin, A. (2001). "IL-18 enhances IL-4 production by ligand-activated NKT lymphocytes: a pro-Th2 effect of IL-18 exerted through NKT cells." *J Immunol* **166**(2): 945-51.
- Leong, C. C., Chapman, T. L., Bjorkman, P. J., Formankova, D., Mocarski, E. S., Phillips, J. H. and Lanier, L. L. (1998). "Modulation of natural killer cell cytotoxicity in human cytomegalovirus infection: the role of endogenous class I major histocompatibility complex and a viral class I homolog." *J Exp Med* **187**(10): 1681-7.
- LeRoith, D., Baserga, R., Helman, L. and Roberts, C. T., Jr. (1995). "Insulin-like growth factors and cancer." *Ann Intern Med* **122**(1): 54-9.
- Levin, E. R. (2009a). "Plasma membrane estrogen receptors." *Trends Endocrinol Metab* **20**(10): 477-82.
- Levin, E. R. (2009b). "Membrane oestrogen receptor alpha signalling to cell functions." *J Physiol* **587**(Pt 21): 5019-23.
- Lewis, J. S., Landers, R. J., Underwood, J. C., Harris, A. L. and Lewis, C. E. (2000). "Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas." *J Pathol* **192**(2): 150-8.
- Li, C. H., Kuo, W. H., Chang, W. C., Huang, S. C., Chang, K. J. and Sheu, B. C. (2011). "Activation of regulatory T cells instigates functional down-regulation of cytotoxic T lymphocytes in human breast cancer." *Immunol Res* **51**(1): 71-9.
- Li, H., Zhu, H., Xu, C. J. and Yuan, J. (1998). "Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis." *Cell* **94**(4): 491-501.
- Li, H., Meininger, C. J., Hawker, J. R., Jr., Haynes, T. E., Kepka-Lenhart, D., Mistry, S. K., Morris, S. M., Jr. and Wu, G. (2001). "Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **280**(1): E75-82.
- Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K. and Flavell, R. A. (2006). "Transforming growth factor-beta regulation of immune responses." *Annu Rev Immunol* **24**: 99-146.
- Lin, E. Y., Nguyen, A. V., Russell, R. G. and Pollard, J. W. (2001). "Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy." *J Exp Med* **193**(6): 727-40.
- Lin, V. C., Eng, A. S., Hen, N. E., Ng, E. H. and Chowdhury, S. H. (2001). "Effect of progesterone on the invasive properties and tumor growth of progesterone receptor-transfected breast cancer cells MDA-MB-231." *Clin Cancer Res* **7**(9): 2880-6.
- Lissoni, P., Malugani, F., Bonfanti, A., Bucovec, R., Secondino, S., Brivio, F., Ferrari-Bravo, A., Ferrante, R., Vigore, L., Rovelli, F., Mandala, M., Viviani, S., Fumagalli, L. and Gardani, G. S. (2001). "Abnormally enhanced blood concentrations of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastatic cancer patients and their relation to circulating dendritic cells, IL-12 and endothelin-1." *J Biol Regul Homeost Agents* **15**(2): 140-4.
- Liu, C., Yu, S., Kappes, J., Wang, J., Grizzle, W. E., Zinn, K. R. and Zhang, H. G. (2007). "Expansion of spleen myeloid suppressor cells represses NK cell cytotoxicity in tumor-bearing host." *Blood* **109**(10): 4336-42.
- Liu, C. C., Walsh, C. M. and Young, J. D. (1995). "Perforin: structure and function." *Immunol Today* **16**(4): 194-201.
- Liu, D., Xu, L., Yang, F., Li, D., Gong, F. and Xu, T. (2005). "Rapid biogenesis and sensitization of secretory lysosomes in NK cells mediated by target-cell recognition." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(1): 123-7.
- Liu, X. Q. and Wang, X. (2009). "Indoleamine 2,3-dioxygenase in tumor induced tolerance." *Chin Med J (Engl)* **122**(24): 3072-7.
- Liuzzi, A., Savia, G., Tagliaferri, M., Lucantoni, R., Berselli, M. E., Petroni, M. L., De Medici, C. and Viberti, G. C. (1999). "Serum leptin concentration in moderate and severe obesity: relationship with clinical, anthropometric and metabolic factors." *Int J Obes Relat Metab Disord* **23**(10): 1066-73.
- Ljunggren, H. G. and Malmberg, K. J. (2007). "Prospects for the use of NK cells in immunotherapy of human cancer." *Nat Rev Immunol* **7**(5): 329-39.

- Llano, M., Lee, N., Navarro, F., Garcia, P., Albar, J. P., Geraghty, D. E. and Lopez-Botet, M. (1998). "HLA-E-bound peptides influence recognition by inhibitory and triggering CD94/NKG2 receptors: preferential response to an HLA-G-derived nonamer." *Eur J Immunol* **28**(9): 2854-63.
- Lo, C. J., Chiu, K. C., Fu, M., Chu, A. and Helton, S. (2000). "Fish oil modulates macrophage P44/P42 mitogen-activated protein kinase activity induced by lipopolysaccharide." *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **24**(3): 159-63.
- Lob, S., Konigsrainer, A., Rammensee, H. G., Opelz, G. and Terness, P. (2009). "Inhibitors of indoleamine-2,3-dioxygenase for cancer therapy: can we see the wood for the trees?" *Nat Rev Cancer* **9**(6): 445-52.
- Lobenhofer, E. K., Huper, G., Iglehart, J. D. and Marks, J. R. (2000). "Inhibition of mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase activity in MCF-7 cells prevents estrogen-induced mitogenesis." *Cell Growth Differ* **11**(2): 99-110.
- Lodolce, J. P., Boone, D. L., Chai, S., Swain, R. E., Dassopoulos, T., Trettin, S. and Ma, A. (1998). "IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation." *Immunity* **9**(5): 669-76.
- Loercher, A. E., Nash, M. A., Kavanagh, J. J., Platsoucas, C. D. and Freedman, R. S. (1999). "Identification of an IL-10-producing HLA-DR-negative monocyte subset in the malignant ascites of patients with ovarian carcinoma that inhibits cytokine protein expression and proliferation of autologous T cells." *J Immunol* **163**(11): 6251-60.
- Loffreda, S., Yang, S. Q., Lin, H. Z., Karp, C. L., Brengman, M. L., Wang, D. J., Klein, A. S., Bulkley, G. B., Bao, C., Noble, P. W., Lane, M. D. and Diehl, A. M. (1998). "Leptin regulates proinflammatory immune responses." *FASEB J* **12**(1): 57-65.
- Loibl, S., von Minckwitz, G., Weber, S., Sinn, H. P., Schini-Kerth, V. B., Lobysheva, I., Nepveu, F., Wolf, G., Strebhardt, K. and Kaufmann, M. (2002). "Expression of endothelial and inducible nitric oxide synthase in benign and malignant lesions of the breast and measurement of nitric oxide using electron paramagnetic resonance spectroscopy." *Cancer* **95**(6): 1191-8.
- Loibl, S., Buck, A., Strank, C., von Minckwitz, G., Roller, M., Sinn, H. P., Schini-Kerth, V., Solbach, C., Strebhardt, K. and Kaufmann, M. (2005). "The role of early expression of inducible nitric oxide synthase in human breast cancer." *Eur J Cancer* **41**(2): 265-71.
- Lokesh, B. R., Sayers, T. J. and Kinsella, J. E. (1990). "Interleukin-1 and tumor necrosis factor synthesis by mouse peritoneal macrophages is enhanced by dietary n-3 polyunsaturated fatty acids." *Immunol Lett* **23**(4): 281-5.
- Long, E. O. (2008). "Negative signaling by inhibitory receptors: the NK cell paradigm." *Immunol Rev* **224**: 70-84.
- Lord, G. M., Matarese, G., Howard, J. K., Baker, R. J., Bloom, S. R. and Lechler, R. I. (1998). "Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression." *Nature* **394**(6696): 897-901.
- Lorincz, A. M. and Sukumar, S. (2006). "Molecular links between obesity and breast cancer." *Endocr Relat Cancer* **13**(2): 279-92.
- Lotzova, E., Savary, C. A. and Champlin, R. E. (1993). "Genesis of human oncolytic natural killer cells from primitive CD34+CD33- bone marrow progenitors." *J Immunol* **150**(12): 5263-9.
- Louis, C. A., Mody, V., Henry, W. L., Jr., Reichner, J. S. and Albina, J. E. (1999). "Regulation of arginase isoforms I and II by IL-4 in cultured murine peritoneal macrophages." *Am J Physiol* **276**(1 Pt 2): R237-42.
- Loza, M. J. and Perussia, B. (2001). "Final steps of natural killer cell maturation: a model for type 1-type 2 differentiation?" *Nat Immunol* **2**(10): 917-24.
- Loza, M. J., Zamai, L., Azzoni, L., Rosati, E. and Perussia, B. (2002). "Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells." *Blood* **99**(4): 1273-81.
- Loza, M. J. and Perussia, B. (2004). "The IL-12 signature: NK cell terminal CD56+high stage and effector functions." *J Immunol* **172**(1): 88-96.
- Lu, I. F., Hasio, A. C., Hu, M. C., Yang, F. M. and Su, H. M. (2010). "Docosahexaenoic acid induces proteasome-dependent degradation of estrogen receptor alpha and inhibits the downstream signaling target in MCF-7 breast cancer cells." *J Nutr Biochem* **21**(6): 512-7.
- Lynch, L. A., O'Connell, J. M., Kwasnik, A. K., Cawood, T. J., O'Farrelly, C. and O'Shea, D. B. (2009). "Are natural killer cells protecting the metabolically healthy obese patient?" *Obesity (Silver Spring)* **17**(3): 601-5.
- Lyons, D. S., Lieberman, S. A., Hampl, J., Boniface, J. J., Chien, Y., Berg, L. J. and Davis, M. M. (1996). "A TCR binds to antagonist ligands with lower affinities and faster dissociation rates than to agonists." *Immunity* **5**(1): 53-61.

-M-

- Macphail, S. E., Gibney, C. A., Brooks, B. M., Booth, C. G., Flanagan, B. F. and Coleman, J. W. (2003). "Nitric oxide regulation of human peripheral blood mononuclear cells: critical time dependence and selectivity for cytokine versus chemokine expression." *J Immunol* **171**(9): 4809-15.
- Maeda, T., Yamada, Y., Moriuchi, R., Sugahara, K., Tsuruda, K., Joh, T., Atogami, S., Tsukasaki, K., Tomonaga, M. and Kamihira, S. (1999). "Fas gene mutation in the progression of adult T cell leukemia." *J Exp Med* **189**(7): 1063-71.
- Maffei, M., Halaas, J., Ravussin, E., Pratley, R. E., Lee, G. H., Zhang, Y., Fei, H., Kim, S., Lallone, R., Ranganathan, S. and et al. (1995). "Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects." *Nat Med* **1**(11): 1155-61.
- Mahabir, S., Baer, D., Johnson, L. L., Roth, M., Campbell, W., Clevidence, B. and Taylor, P. R. (2007). "Body Mass Index, percent body fat, and regional body fat distribution in relation to leptin concentrations in healthy, non-smoking postmenopausal women in a feeding study." *Nutr J* **6**: 3.
- Mahrus, S. and Craik, C. S. (2005). "Selective chemical functional probes of granzymes A and B reveal granzyme B is a major effector of natural killer cell-mediated lysis of target cells." *Chem Biol* **12**(5): 567-77.
- Maldonado, R. A. and von Andrian, U. H. (2010). "How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells." *Adv Immunol* **108**: 111-65.
- Mamessier, E., Sylvain, A., Bertucci, F., Castellano, R., Finetti, P., Houvenaeghel, G., Charaffe-Jaufret, E., Birnbaum, D., Moretta, A. and Olive, D. (2011). "Human breast tumor cells induce self-tolerance mechanisms to avoid NKG2D-mediated and DNAM-mediated NK cell recognition." *Cancer Res* **71**(21): 6621-32.
- Mancuso, P., Canetti, C., Gottschalk, A., Tithof, P. K. and Peters-Golden, M. (2004). "Leptin augments alveolar macrophage leukotriene synthesis by increasing phospholipase activity and enhancing group IVC iPLA2 (cPLA2gamma) protein expression." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **287**(3): L497-502.
- Mandelboim, O., Reyburn, H. T., Vales-Gomez, M., Pazmany, L., Colonna, M., Borsellino, G. and Strominger, J. L. (1996). "Protection from lysis by natural killer cells of group 1 and 2 specificity is mediated by residue 80 in human histocompatibility leukocyte antigen C alleles and also occurs with empty major histocompatibility complex molecules." *J Exp Med* **184**(3): 913-22.
- Mandelboim, O., Lieberman, N., Lev, M., Paul, L., Arnon, T. I., Bushkin, Y., Davis, D. M., Strominger, J. L., Yewdell, J. W. and Porgador, A. (2001). "Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by Nkp46 activates lysis by human NK cells." *Nature* **409**(6823): 1055-60.
- Mandelbrot, D. A., McAdam, A. J. and Sharpe, A. H. (1999). "B7-1 or B7-2 is required to produce the lymphoproliferative phenotype in mice lacking cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4)." *J Exp Med* **189**(2): 435-40.
- Mantovani, A. (1999). "The chemokine system: redundancy for robust outputs." *Immunol Today* **20**(6): 254-7.
- Mantovani, A., Sozzani, S., Locati, M., Allavena, P. and Sica, A. (2002). "Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes." *Trends Immunol* **23**(11): 549-55.
- Mantovani, A. and Sica, A. (2010). "Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity." *Curr Opin Immunol* **22**(2): 231-7.
- Mao, A., Paharkova-Vatchkova, V., Hardy, J., Miller, M. M. and Kovats, S. (2005). "Estrogen selectively promotes the differentiation of dendritic cells with characteristics of Langerhans cells." *J Immunol* **175**(8): 5146-51.
- Marcet-Palacios, M., Odemuyiwa, S. O., Coughlin, J. J., Garofoli, D., Ewen, C., Davidson, C. E., Ghaffari, M., Kane, K. P., Lacy, P., Logan, M. R., Befus, A. D., Bleackley, R. C. and Moqbel, R. (2008). "Vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP-7) is essential for target cell killing in a natural killer cell line." *Biochem Biophys Res Commun* **366**(3): 617-23.
- Maret, A., Coudert, J. D., Garidou, L., Foucras, G., Gourdy, P., Krust, A., Dupont, S., Chambon, P., Druet, P., Bayard, F. and Guery, J. C. (2003). "Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells." *Eur J Immunol* **33**(2): 512-21.
- Marin, R., Ruiz-Cabello, F., Pedrinaci, S., Mendez, R., Jimenez, P., Geraghty, D. E. and Garrido, F. (2003). "Analysis of HLA-E expression in human tumors." *Immunogenetics* **54**(11): 767-75.
- Marti, A., Marcos, A. and Martinez, J. A. (2001). "Obesity and immune function relationships." *Obes Rev* **2**(2): 131-40.
- Martin-Fontecha, A., Thomsen, L. L., Brett, S., Gerard, C., Lipp, M., Lanzavecchia, A. and Sallusto, F. (2004). "Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming." *Nat Immunol* **5**(12): 1260-5.

- Martin-Romero, C., Santos-Alvarez, J., Goberna, R. and Sanchez-Margalet, V. (2000). "Human leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes." *Cell Immunol* **199**(1): 15-24.
- Martin, A. M., Kulski, J. K., Witt, C., Pontarotti, P. and Christiansen, F. T. (2002). "Leukocyte Ig-like receptor complex (LRC) in mice and men." *Trends Immunol* **23**(2): 81-8.
- Martin, M. P., Pascal, V., Yeager, M., Phair, J., Kirk, G. D., Hoots, K., O'Brien, S. J., Anderson, S. K. and Carrington, M. (2007). "A mutation in KIR3DS1 that results in truncation and lack of cell surface expression." *Immunogenetics* **59**(10): 823-9.
- Martinvalet, D., Zhu, P. and Lieberman, J. (2005). "Granzyme A induces caspase-independent mitochondrial damage, a required first step for apoptosis." *Immunity* **22**(3): 355-70.
- Martinvalet, D., Dykxhoorn, D. M., Ferrini, R. and Lieberman, J. (2008). "Granzyme A cleaves a mitochondrial complex I protein to initiate caspase-independent cell death." *Cell* **133**(4): 681-92.
- Masilamani, M., Nguyen, C., Kabat, J., Borrego, F. and Coligan, J. E. (2006). "CD94/NKG2A inhibits NK cell activation by disrupting the actin network at the immunological synapse." *J Immunol* **177**(6): 3590-6.
- Masopust, D., Kaech, S. M., Wherry, E. J. and Ahmed, R. (2004). "The role of programming in memory T-cell development." *Curr Opin Immunol* **16**(2): 217-25.
- Massague, J. (2008). "TGFbeta in Cancer." *Cell* **134**(2): 215-30.
- Matalka, K. Z. (2003). "The effect of estradiol, but not progesterone, on the production of cytokines in stimulated whole blood, is concentration-dependent." *Neuro Endocrinol Lett* **24**(3-4): 185-91.
- Matarese, G., Moschos, S. and Mantzoros, C. S. (2005). "Leptin in immunology." *J Immunol* **174**(6): 3137-42.
- Mates, J. M. (2000). "Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology." *Toxicology* **153**(1-3): 83-104.
- Matos, M. E., Schnier, G. S., Beecher, M. S., Ashman, L. K., William, D. E. and Caligiuri, M. A. (1993). "Expression of a functional c-kit receptor on a subset of natural killer cells." *J Exp Med* **178**(3): 1079-84.
- Mattioli, B., Straface, E., Quaranta, M. G., Giordani, L. and Viora, M. (2005). "Leptin promotes differentiation and survival of human dendritic cells and licenses them for Th1 priming." *J Immunol* **174**(11): 6820-8.
- Mattioli, B., Straface, E., Matarrese, P., Quaranta, M. G., Giordani, L., Malorni, W. and Viora, M. (2008). "Leptin as an immunological adjuvant: enhanced migratory and CD8+ T cell stimulatory capacity of human dendritic cells exposed to leptin." *FASEB J* **22**(6): 2012-22.
- Mattioli, B., Giordani, L., Quaranta, M. G. and Viora, M. (2009). "Leptin exerts an anti-apoptotic effect on human dendritic cells via the PI3K-Akt signaling pathway." *FEBS Lett* **583**(7): 1102-6.
- Mauro, L., Catalano, S., Bossi, G., Pellegrino, M., Barone, I., Morales, S., Giordano, C., Bartella, V., Casaburi, I. and Ando, S. (2007). "Evidences that leptin up-regulates E-cadherin expression in breast cancer: effects on tumor growth and progression." *Cancer Res* **67**(7): 3412-21.
- Mavilio, D., Lombardo, G., Benjamin, J., Kim, D., Follman, D., Marcenaro, E., O'Shea, M. A., Kinter, A., Kovacs, C., Moretta, A. and Fauci, A. S. (2005). "Characterization of CD56-/CD16+ natural killer (NK) cells: a highly dysfunctional NK subset expanded in HIV-infected viremic individuals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(8): 2886-91.
- Mavilio, D., Lombardo, G., Kinter, A., Fogli, M., La Sala, A., Ortolano, S., Farschi, A., Follmann, D., Gregg, R., Kovacs, C., Marcenaro, E., Pende, D., Moretta, A. and Fauci, A. S. (2006). "Characterization of the defective interaction between a subset of natural killer cells and dendritic cells in HIV-1 infection." *J Exp Med* **203**(10): 2339-50.
- Mavoungou, E., Held, J., Mewono, L. and Kremsner, P. G. (2007). "A Duffy binding-like domain is involved in the NKp30-mediated recognition of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes by natural killer cells." *J Infect Dis* **195**(10): 1521-31.
- Mazzoni, A., Bronte, V., Visintin, A., Spitzer, J. H., Apolloni, E., Serafini, P., Zanovello, P. and Segal, D. M. (2002). "Myeloid suppressor lines inhibit T cell responses by an NO-dependent mechanism." *J Immunol* **168**(2): 689-95.
- McArthur, M. J., Atshaves, B. P., Frolov, A., Foxworth, W. D., Kier, A. B. and Schroeder, F. (1999). "Cellular uptake and intracellular trafficking of long chain fatty acids." *J Lipid Res* **40**(8): 1371-83.
- McCann, F. E., Vanherberghen, B., Eleme, K., Carlin, L. M., Newsam, R. J., Goulding, D. and Davis, D. M. (2003). "The size of the synaptic cleft and distinct distributions of filamentous actin, ezrin, CD43, and CD45 at activating and inhibitory human NK cell immune synapses." *J Immunol* **170**(6): 2862-70.
- McCann, F. E., Eissmann, P., Onfelt, B., Leung, R. and Davis, D. M. (2007). "The activating NKG2D ligand MHC class I-related chain A transfers from target cells to NK cells in a manner that allows functional consequences." *J Immunol* **178**(6): 3418-26.
- McDonnell, D. P. and Norris, J. D. (2002). "Connections and regulation of the human estrogen receptor." *Science* **296**(5573): 1642-4.
- McGhee, J. R. (2005). "The world of TH1/TH2 subsets: first proof." *J Immunol* **175**(1): 3-4.

- McGilvray, R. W., Eagle, R. A., Watson, N. F., Al-Attar, A., Ball, G., Jafferji, I., Trowsdale, J. and Durrant, L. G. (2009). "NKG2D ligand expression in human colorectal cancer reveals associations with prognosis and evidence for immunoediting." *Clin Cancer Res* **15**(22): 6993-7002.
- McGilvray, R. W., Eagle, R. A., Rolland, P., Jafferji, I., Trowsdale, J. and Durrant, L. G. (2010). "ULBP2 and RAET1E NKG2D ligands are independent predictors of poor prognosis in ovarian cancer patients." *Int J Cancer* **127**(6): 1412-20.
- McHeyzer-Williams, L. J. and McHeyzer-Williams, M. G. (2005). "Antigen-specific memory B cell development." *Annu Rev Immunol* **23**: 487-513.
- Meadows, S. K., Eriksson, M., Barber, A. and Sentman, C. L. (2006). "Human NK cell IFN-gamma production is regulated by endogenous TGF-beta." *Int Immunopharmacol* **6**(6): 1020-8.
- Meazza, R., Lollini, P. L., Nanni, P., De Giovanni, C., Gaggero, A., Comes, A., Cilli, M., Di Carlo, E., Ferrini, S. and Musiani, P. (2000). "Gene transfer of a secretable form of IL-15 in murine adenocarcinoma cells: effects on tumorigenicity, metastatic potential and immune response." *Int J Cancer* **87**(4): 574-81.
- Meazza, R., Azzarone, B., Orengo, A. M. and Ferrini, S. (2011). "Role of common-gamma chain cytokines in NK cell development and function: perspectives for immunotherapy." *J Biomed Biotechnol* **2011**: 861920.
- Melani, C., Chiodoni, C., Forni, G. and Colombo, M. P. (2003). "Myeloid cell expansion elicited by the progression of spontaneous mammary carcinomas in c-erbB-2 transgenic BALB/c mice suppresses immune reactivity." *Blood* **102**(6): 2138-45.
- Menendez, J. A. (2010). "Fine-tuning the lipogenic/lipolytic balance to optimize the metabolic requirements of cancer cell growth: molecular mechanisms and therapeutic perspectives." *Biochim Biophys Acta* **1801**(3): 381-91.
- Mescher, M. F., Agarwal, P., Casey, K. A., Hammerbeck, C. D., Xiao, Z. and Curtsinger, J. M. (2007). "Molecular basis for checkpoints in the CD8 T cell response: tolerance versus activation." *Semin Immunol* **19**(3): 153-61.
- Metkar, S. S., Wang, B., Ebbs, M. L., Kim, J. H., Lee, Y. J., Raja, S. M. and Froelich, C. J. (2003). "Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis." *J Cell Biol* **160**(6): 875-85.
- Meydani, S. N., Endres, S., Woods, M. M., Goldin, B. R., Soo, C., Morrill-Labrode, A., Dinarello, C. A. and Gorbach, S. L. (1991). "Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women." *J Nutr* **121**(4): 547-55.
- Miah, S. M., Hughes, T. L. and Campbell, K. S. (2008). "KIR2DL4 differentially signals downstream functions in human NK cells through distinct structural modules." *J Immunol* **180**(5): 2922-32.
- Michaelsson, J., Teixeira de Matos, C., Achour, A., Lanier, L. L., Karre, K. and Soderstrom, K. (2002). "A signal peptide derived from hsp60 binds HLA-E and interferes with CD94/NKG2A recognition." *J Exp Med* **196**(11): 1403-14.
- Miller, J. S., Verfaillie, C. and McGlave, P. (1992). "The generation of human natural killer cells from CD34+/DR- primitive progenitors in long-term bone marrow culture." *Blood* **80**(9): 2182-7.
- Miller, J. S., McCullar, V., Punzel, M., Lemischka, I. R. and Moore, K. A. (1999). "Single adult human CD34(+)/Lin-/CD38(-) progenitors give rise to natural killer cells, B-lineage cells, dendritic cells, and myeloid cells." *Blood* **93**(1): 96-106.
- Minard-Colin, V., Xiu, Y., Poe, J. C., Horikawa, M., Magro, C. M., Hamaguchi, Y., Haas, K. M. and Tedder, T. F. (2008). "Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage FcgammaRI, FcgammaRIII, and FcgammaRIV." *Blood* **112**(4): 1205-13.
- Minden, M. D. and Mak, T. W. (1986). "The structure of the T cell antigen receptor genes in normal and malignant T cells." *Blood* **68**(2): 327-36.
- Mlecnik, B., Bindea, G., Pages, F. and Galon, J. (2011). "Tumor immunosurveillance in human cancers." *Cancer Metastasis Rev* **30**(1): 5-12.
- Mo, R., Chen, J., Grolleau-Julius, A., Murphy, H. S., Richardson, B. C. and Yung, R. L. (2005). "Estrogen regulates CCR gene expression and function in T lymphocytes." *J Immunol* **174**(10): 6023-9.
- Mocellin, S., Provenzano, M., Rossi, C. R., Pilati, P., Scalerna, R., Lise, M. and Nitti, D. (2004). "Induction of endothelial nitric oxide synthase expression by melanoma sensitizes endothelial cells to tumor necrosis factor-driven cytotoxicity." *Clin Cancer Res* **10**(20): 6879-86.
- Mocellin, S., Marincola, F. M. and Young, H. A. (2005). "Interleukin-10 and the immune response against cancer: a counterpoint." *J Leukoc Biol* **78**(5): 1043-51.
- Moesta, A. K., Norman, P. J., Yawata, M., Yawata, N., Gleimer, M. and Parham, P. (2008). "Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand-binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA-C than KIR2DL3." *J Immunol* **180**(6): 3969-79.

- Monks, C. R., Kupfer, H., Tamir, I., Barlow, A. and Kupfer, A. (1997). "Selective modulation of protein kinase C-theta during T-cell activation." *Nature* **385**(6611): 83-6.
- Monks, C. R., Freiberg, B. A., Kupfer, H., Sciaky, N. and Kupfer, A. (1998). "Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells." *Nature* **395**(6697): 82-6.
- Montel, A. H., Bochan, M. R., Hobbs, J. A., Lynch, D. H. and Brahmi, Z. (1995). "Fas involvement in cytotoxicity mediated by human NK cells." *Cell Immunol* **166**(2): 236-46.
- Monti, P., Leone, B. E., Zerbi, A., Balzano, G., Cainarca, S., Sordi, V., Pontillo, M., Mercalli, A., Di Carlo, V., Allavena, P. and Piemonti, L. (2004). "Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL-10^{high}IL-12^{low} regulatory dendritic cell." *J Immunol* **172**(12): 7341-9.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L. and O'Garra, A. (2001). "Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor." *Annu Rev Immunol* **19**: 683-765.
- Moore, T., Beltran, L., Carbajal, S., Strom, S., Traag, J., Hursting, S. D. and DiGiovanni, J. (2008a). "Dietary energy balance modulates signaling through the Akt/mammalian target of rapamycin pathways in multiple epithelial tissues." *Cancer Prev Res (Phila)* **1**(1): 65-76.
- Moore, T., Carbajal, S., Beltran, L., Perkins, S. N., Yakar, S., Leroith, D., Hursting, S. D. and Digiovanni, J. (2008b). "Reduced susceptibility to two-stage skin carcinogenesis in mice with low circulating insulin-like growth factor I levels." *Cancer Res* **68**(10): 3680-8.
- Mor, G., Sapi, E., Abrahams, V. M., Rutherford, T., Song, J., Hao, X. Y., Muzaffar, S. and Kohen, F. (2003). "Interaction of the estrogen receptors with the Fas ligand promoter in human monocytes." *J Immunol* **170**(1): 114-22.
- Moraes, L. A., Piqueras, L. and Bishop-Bailey, D. (2006). "Peroxisome proliferator-activated receptors and inflammation." *Pharmacol Ther* **110**(3): 371-85.
- Moreau, P., Adrian-Cabestre, F., Menier, C., Guiard, V., Gourand, L., Dausset, J., Carosella, E. D. and Paul, P. (1999). "IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes." *Int Immunol* **11**(5): 803-11.
- Morel, E. and Bellon, T. (2008). "HLA class I molecules regulate IFN-gamma production induced in NK cells by target cells, viral products, or immature dendritic cells through the inhibitory receptor ILT2/CD85j." *J Immunol* **181**(4): 2368-81.
- Moretta, A., Sivori, S., Vitale, M., Pende, D., Morelli, L., Augugliaro, R., Bottino, C. and Moretta, L. (1995). "Existence of both inhibitory (p58) and activatory (p50) receptors for HLA-C molecules in human natural killer cells." *J Exp Med* **182**(3): 875-84.
- Moretta, A., Bottino, C., Vitale, M., Pende, D., Cantoni, C., Mingari, M. C., Biassoni, R. and Moretta, L. (2001). "Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity." *Annu Rev Immunol* **19**: 197-223.
- Moretta, A. (2005). "The dialogue between human natural killer cells and dendritic cells." *Curr Opin Immunol* **17**(3): 306-11.
- Moretta, A., Marcenaro, E., Sivori, S., Della Chiesa, M., Vitale, M. and Moretta, L. (2005). "Early liaisons between cells of the innate immune system in inflamed peripheral tissues." *Trends Immunol* **26**(12): 668-75.
- Morishita, M., Miyagi, M. and Iwamoto, Y. (1999). "Effects of sex hormones on production of interleukin-1 by human peripheral monocytes." *J Periodontol* **70**(7): 757-60.
- Morita, C. T., Verma, S., Aparicio, P., Martinez, C., Spits, H. and Brenner, M. B. (1991). "Functionally distinct subsets of human gamma/delta T cells." *Eur J Immunol* **21**(12): 2999-3007.
- Morita, C. T., Beckman, E. M., Bukowski, J. F., Tanaka, Y., Band, H., Bloom, B. R., Golan, D. E. and Brenner, M. B. (1995). "Direct presentation of nonpeptide prenyl pyrophosphate antigens to human gamma delta T cells." *Immunity* **3**(4): 495-507.
- Morita, M., Motoki, K., Akimoto, K., Natori, T., Sakai, T., Sawa, E., Yamaji, K., Koezuka, Y., Kobayashi, E. and Fukushima, H. (1995). "Structure-activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice." *J Med Chem* **38**(12): 2176-87.
- Morris, S. M., Jr. (2002). "Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism." *Annu Rev Nutr* **22**: 87-105.
- Mortier, E., Woo, T., Advincula, R., Gozalo, S. and Ma, A. (2008). "IL-15Ralpha chaperones IL-15 to stable dendritic cell membrane complexes that activate NK cells via trans presentation." *J Exp Med* **205**(5): 1213-25.
- Mortier, E., Advincula, R., Kim, L., Chmura, S., Barrera, J., Reizis, B., Malynn, B. A. and Ma, A. (2009). "Macrophage- and dendritic-cell-derived interleukin-15 receptor alpha supports homeostasis of distinct CD8⁺ T cell subsets." *Immunity* **31**(5): 811-22.

- Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A. and Coffman, R. L. (1986). "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." *J Immunol* **136**(7): 2348-57.
- Motyka, B., Korbitt, G., Pinkoski, M. J., Heibei, J. A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C. F., Gauldie, J. and Bleackley, R. C. (2000). "Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis." *Cell* **103**(3): 491-500.
- Moussa, M., Le Boucher, J., Garcia, J., Tkaczuk, J., Ragab, J., Dutot, G., Ohayon, E., Ghisolfi, J. and Thouvenot, J. P. (2000). "In vivo effects of olive oil-based lipid emulsion on lymphocyte activation in rats." *Clin Nutr* **19**(1): 49-54.
- Moustakas, A., Souchevnytskyi, S. and Heldin, C. H. (2001). "Smad regulation in TGF-beta signal transduction." *J Cell Sci* **114**(Pt 24): 4359-69.
- Mrozek, E., Anderson, P. and Caligiuri, M. A. (1996). "Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells." *Blood* **87**(7): 2632-40.
- Mukaro, V. R., Costabile, M., Murphy, K. J., Hii, C. S., Howe, P. R. and Ferrante, A. (2008). "Leukocyte numbers and function in subjects eating n-3 enriched foods: selective depression of natural killer cell levels." *Arthritis Res Ther* **10**(3): R57.
- Muller, A. J., DuHadaway, J. B., Donover, P. S., Sutanto-Ward, E. and Prendergast, G. C. (2005). "Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase, an immunoregulatory target of the cancer suppression gene Bin1, potentiates cancer chemotherapy." *Nat Med* **11**(3): 312-9.
- Munder, M., Mollinedo, F., Calafat, J., Canchado, J., Gil-Lamaignere, C., Fuentes, J. M., Luckner, C., Doschko, G., Soler, G., Eichmann, K., Muller, F. M., Ho, A. D., Goerner, M. and Modolell, M. (2005). "Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity." *Blood* **105**(6): 2549-56.
- Munder, M., Schneider, H., Luckner, C., Giese, T., Langhans, C. D., Fuentes, J. M., Kropf, P., Mueller, I., Kolb, A., Modolell, M. and Ho, A. D. (2006). "Suppression of T-cell functions by human granulocyte arginase." *Blood* **108**(5): 1627-34.
- Munger, W., DeJoy, S. Q., Jeyaseelan, R., Sr., Torley, L. W., Grabstein, K. H., Eisenmann, J., Paxton, R., Cox, T., Wick, M. M. and Kerwar, S. S. (1995). "Studies evaluating the antitumor activity and toxicity of interleukin-15, a new T cell growth factor: comparison with interleukin-2." *Cell Immunol* **165**(2): 289-93.
- Munn, D. H., Zhou, M., Attwood, J. T., Bondarev, I., Conway, S. J., Marshall, B., Brown, C. and Mellor, A. L. (1998). "Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism." *Science* **281**(5380): 1191-3.
- Munn, D. H., Shafizadeh, E., Attwood, J. T., Bondarev, I., Pashine, A. and Mellor, A. L. (1999). "Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism." *J Exp Med* **189**(9): 1363-72.
- Munn, D. H., Sharma, M. D., Lee, J. R., Jhaver, K. G., Johnson, T. S., Keskin, D. B., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, S. J., Burgess, R., Slingluff, C. L., Jr. and Mellor, A. L. (2002). "Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase." *Science* **297**(5588): 1867-70.
- Munn, D. H., Sharma, M. D., Hou, D., Baban, B., Lee, J. R., Antonia, S. J., Messina, J. L., Chandler, P., Koni, P. A. and Mellor, A. L. (2004). "Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes." *J Clin Invest* **114**(2): 280-90.
- Munn, D. H., Sharma, M. D., Baban, B., Harding, H. P., Zhang, Y., Ron, D. and Mellor, A. L. (2005). "GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase." *Immunity* **22**(5): 633-42.
- Munn, D. H. and Mellor, A. L. (2007). "Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance." *J Clin Invest* **117**(5): 1147-54.
- Munro, S. (2003). "Lipid rafts: elusive or illusive?" *Cell* **115**(4): 377-88.
- Murakami, K., Ide, T., Suzuki, M., Mochizuki, T. and Kadowaki, T. (1999). "Evidence for direct binding of fatty acids and eicosanoids to human peroxisome proliferators-activated receptor alpha." *Biochem Biophys Res Commun* **260**(3): 609-13.
- Murphy, A. J., Guyre, P. M., Wira, C. R. and Pioli, P. A. (2009). "Estradiol regulates expression of estrogen receptor ERalpha46 in human macrophages." *PLoS One* **4**(5): e5539.
- Myers, M. G., Cowley, M. A. and Munzberg, H. (2008). "Mechanisms of leptin action and leptin resistance." *Annu Rev Physiol* **70**: 537-56.

-N-

- Najib, S. and Sanchez-Margalet, V. (2002). "Human leptin promotes survival of human circulating blood monocytes prone to apoptosis by activation of p42/44 MAPK pathway." *Cell Immunol* **220**(2): 143-9.
- Nakagawa, R., Serizawa, I., Motoki, K., Sato, M., Ueno, H., Iijima, R., Nakamura, H., Shimosaka, A. and Koezuka, Y. (2000). "Antitumor activity of alpha-galactosylceramide, KR7000, in mice with the

- melanoma B16 hepatic metastasis and immunohistological study of tumor infiltrating cells." *Oncol Res* **12**(2): 51-8.
- Nausch, N. and Cerwenka, A. (2008). "NKG2D ligands in tumor immunity." *Oncogene* **27**(45): 5944-58.
- Navarro-Tito, N., Robledo, T. and Salazar, E. P. (2008). "Arachidonic acid promotes FAK activation and migration in MDA-MB-231 breast cancer cells." *Exp Cell Res* **314**(18): 3340-55.
- Navarro, F., Llano, M., Bellon, T., Colonna, M., Geraghty, D. E. and Lopez-Botet, M. (1999). "The ILT2(LIR1) and CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules co-expressed on target cells." *Eur J Immunol* **29**(1): 277-83.
- Nave, H., Mueller, G., Siegmund, B., Jacobs, R., Stroh, T., Schueler, U., Hopfe, M., Behrendt, P., Buchenauer, T., Pabst, R. and Brabant, G. (2008). "Resistance of Janus kinase-2 dependent leptin signaling in natural killer (NK) cells: a novel mechanism of NK cell dysfunction in diet-induced obesity." *Endocrinology* **149**(7): 3370-8.
- Naylor, M. S., Stamp, G. W., Davies, B. D. and Balkwill, F. R. (1994). "Expression and activity of MMPs and their regulators in ovarian cancer." *Int J Cancer* **58**(1): 50-6.
- Neefjes, J., Jongsma, M. L., Paul, P. and Bakke, O. (2011). "Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation." *Nat Rev Immunol* **11**(12): 823-36.
- Negulescu, P. A., Shastri, N. and Cahalan, M. D. (1994). "Intracellular calcium dependence of gene expression in single T lymphocytes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(7): 2873-7.
- Nelson, B. H. and Willerford, D. M. (1998). "Biology of the interleukin-2 receptor." *Adv Immunol* **70**: 1-81.
- Nieto, M., Navarro, F., Perez-Villar, J. J., del Pozo, M. A., Gonzalez-Amaro, R., Mellado, M., Frade, J. M., Martinez, A. C., Lopez-Botet, M. and Sanchez-Madrid, F. (1998). "Roles of chemokines and receptor polarization in NK-target cell interactions." *J Immunol* **161**(7): 3330-9.
- Nieves, C., Jr. and Langkamp-Henken, B. (2002). "Arginine and immunity: a unique perspective." *Biomed Pharmacother* **56**(10): 471-82.
- Nimer, S. D. and Uchida, H. (1995). "Regulation of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin 3 expression." *Stem Cells* **13**(4): 324-35.
- Norian, L. A., Rodriguez, P. C., O'Mara, L. A., Zabaleta, J., Ochoa, A. C., Cella, M. and Allen, P. M. (2009). "Tumor-infiltrating regulatory dendritic cells inhibit CD8+ T cell function via L-arginine metabolism." *Cancer Res* **69**(7): 3086-94.
- Norrby, K. (2000). "Constitutively synthesized nitric oxide is a physiological negative regulator of mammalian angiogenesis mediated by basic fibroblast growth factor." *Int J Exp Pathol* **81**(6): 423-7.
- O-
- O'Connor, G. M., Guinan, K. J., Cunningham, R. T., Middleton, D., Parham, P. and Gardiner, C. M. (2007). "Functional polymorphism of the KIR3DL1/S1 receptor on human NK cells." *J Immunol* **178**(1): 235-41.
- O'Hayre, M., Salanga, C. L., Handel, T. M. and Allen, S. J. (2008). "Chemokines and cancer: migration, intracellular signalling and intercellular communication in the microenvironment." *Biochem J* **409**(3): 635-49.
- O'Lone, R., Frith, M. C., Karlsson, E. K. and Hansen, U. (2004). "Genomic targets of nuclear estrogen receptors." *Mol Endocrinol* **18**(8): 1859-75.
- O'Neill, J. S., Elton, R. A. and Miller, W. R. (1988). "Aromatase activity in adipose tissue from breast quadrants: a link with tumour site." *Br Med J (Clin Res Ed)* **296**(6624): 741-3.
- O'Rourke, R. W., Kay, T., Scholz, M. H., Diggs, B., Jobe, B. A., Lewinsohn, D. M. and Bakke, A. C. (2005). "Alterations in T-cell subset frequency in peripheral blood in obesity." *Obes Surg* **15**(10): 1463-8.
- O'Shea, D., Cawood, T. J., O'Farrelly, C. and Lynch, L. (2010). "Natural killer cells in obesity: impaired function and increased susceptibility to the effects of cigarette smoke." *PLoS One* **5**(1): e8660.
- Oberlies, J., Watzl, C., Giese, T., Luckner, C., Kropf, P., Muller, I., Ho, A. D. and Munder, M. (2009). "Regulation of NK cell function by human granulocyte arginase." *J Immunol* **182**(9): 5259-67.
- Ogawa, M., Nishiura, T., Yoshimura, M., Horikawa, Y., Yoshida, H., Okajima, Y., Matsumura, I., Ishikawa, J., Nakao, H., Tomiyama, Y., Kanayama, Y., Kanakura, Y. and Matsuzawa, Y. (1998). "Decreased nitric oxide-mediated natural killer cell activation in chronic fatigue syndrome." *Eur J Clin Invest* **28**(11): 937-43.
- Okamoto, A., Nikaido, T., Ochiai, K., Takakura, S., Saito, M., Aoki, Y., Ishii, N., Yanaihara, N., Yamada, K., Takikawa, O., Kawaguchi, R., Isonishi, S., Tanaka, T. and Urashima, M. (2005). "Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serous ovarian cancer cells." *Clin Cancer Res* **11**(16): 6030-9.
- Okumura, M., Yamamoto, M., Sakuma, H., Kojima, T., Maruyama, T., Jamali, M., Cooper, D. R. and Yasuda, K. (2002). "Leptin and high glucose stimulate cell proliferation in MCF-7 human breast cancer cells: reciprocal involvement of PKC-alpha and PPAR expression." *Biochim Biophys Acta* **1592**(2): 107-16.

- Olson, L. K., Tan, Y., Zhao, Y., Aupperlee, M. D. and Haslam, S. Z. (2010). "Pubertal exposure to high fat diet causes mouse strain-dependent alterations in mammary gland development and estrogen responsiveness." Int J Obes (Lond) **34**(9): 1415-26.
- Onda, H., Ohkubo, S., Shintani, Y., Ogi, K., Kikuchi, K., Tanaka, H., Yamamoto, K., Tsuji, I., Ishibashi, Y., Yamada, T., Kitada, C., Suzuki, N., Sawada, H., Nishimura, O. and Fujino, M. (2001). "A novel secreted tumor antigen with a glycosylphosphatidylinositol-anchored structure ubiquitously expressed in human cancers." Biochem Biophys Res Commun **285**(2): 235-43.
- Oppenheim, D. E., Roberts, S. J., Clarke, S. L., Filler, R., Lewis, J. M., Tigelaar, R. E., Girardi, M. and Hayday, A. C. (2005). "Sustained localized expression of ligand for the activating NKG2D receptor impairs natural cytotoxicity in vivo and reduces tumor immunosurveillance." Nat Immunol **6**(9): 928-37.
- Orange, J. S., Ramesh, N., Remold-O'Donnell, E., Sasahara, Y., Koopman, L., Byrne, M., Bonilla, F. A., Rosen, F. S., Geha, R. S. and Strominger, J. L. (2002). "Wiskott-Aldrich syndrome protein is required for NK cell cytotoxicity and colocalizes with actin to NK cell-activating immunologic synapses." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(17): 11351-6.
- Orange, J. S. (2008). "Formation and function of the lytic NK-cell immunological synapse." Nat Rev Immunol **8**(9): 713-25.
- Ordonez-Moran, P. and Munoz, A. (2009). "Nuclear receptors: genomic and non-genomic effects converge." Cell Cycle **8**(11): 1675-80.
- Oyama, T., Ran, S., Ishida, T., Nadaf, S., Kerr, L., Carbone, D. P. and Gabrilovich, D. I. (1998). "Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells." J Immunol **160**(3): 1224-32.
- P-
- Pages, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Asslaber, M., Tosolini, M., Bindea, G., Lagorce, C., Wind, P., Marliot, F., Bruneval, P., Zatloukal, K., Trajanoski, Z., Berger, A., Fridman, W. H. and Galon, J. (2009). "In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer." J Clin Oncol **27**(35): 5944-51.
- Paharkova-Vatchkova, V., Maldonado, R. and Kovats, S. (2004). "Estrogen preferentially promotes the differentiation of CD11c⁺ CD11b(intermediate) dendritic cells from bone marrow precursors." J Immunol **172**(3): 1426-36.
- Pai, R., Szabo, I. L., Soreghan, B. A., Atay, S., Kawanaka, H. and Tarnawski, A. S. (2001). "PGE(2) stimulates VEGF expression in endothelial cells via ERK2/JNK1 signaling pathways." Biochem Biophys Res Commun **286**(5): 923-8.
- Palmer, E. M. and van Seventer, G. A. (1997). "Human T helper cell differentiation is regulated by the combined action of cytokines and accessory cell-dependent costimulatory signals." J Immunol **158**(6): 2654-62.
- Pandey, R., DeStephan, C. M., Madge, L. A., May, M. J. and Orange, J. S. (2007). "NKp30 ligation induces rapid activation of the canonical NF-kappaB pathway in NK cells." J Immunol **179**(11): 7385-96.
- Pando, M. J., Gardiner, C. M., Gleimer, M., McQueen, K. L. and Parham, P. (2003). "The protein made from a common allele of KIR3DL1 (3DL1*004) is poorly expressed at cell surfaces due to substitution at positions 86 in Ig domain 0 and 182 in Ig domain 1." J Immunol **171**(12): 6640-9.
- Paolucci, C., Burastero, S. E., Rovere-Querini, P., De Palma, C., Falcone, S., Perrotta, C., Capobianco, A., Manfredi, A. A. and Clementi, E. (2003). "Synergism of nitric oxide and maturation signals on human dendritic cells occurs through a cyclic GMP-dependent pathway." J Leukoc Biol **73**(2): 253-62.
- Pappas, T. C., Gametchu, B. and Watson, C. S. (1995). "Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding." FASEB J **9**(5): 404-10.
- Park, H., Byun, D., Kim, T. S., Kim, Y. I., Kang, J. S., Hahm, E. S., Kim, S. H., Lee, W. J., Song, H. K., Yoon, D. Y., Kang, C. J., Lee, C., Houh, D., Kim, H., Cho, B., Kim, Y., Yang, Y. H., Min, K. H. and Cho, D. H. (2001). "Enhanced IL-18 expression in common skin tumors." Immunol Lett **79**(3): 215-9.
- Park, H., Kim, M., Kwon, G. T., Lim, D. Y., Yu, R., Sung, M. K., Lee, K. W., Daily, J. W., 3rd and Park, J. H. (2011). "A high-fat diet increases angiogenesis, solid tumor growth, and lung metastasis of CT26 colon cancer cells in obesity-resistant BALB/c mice." Mol Carcinog.
- Park, I. S., Kang, S. W., Shin, Y. J., Chae, K. Y., Park, M. O., Kim, M. Y., Wheatley, D. N. and Min, B. H. (2003). "Arginine deiminase: a potential inhibitor of angiogenesis and tumour growth." Br J Cancer **89**(5): 907-14.
- Parolini, S., Santoro, A., Marcenaro, E., Luini, W., Massardi, L., Facchetti, F., Communi, D., Parmentier, M., Majorana, A., Sironi, M., Tabellini, G., Moretta, A. and Sozzani, S. (2007). "The role of chemerin in the colocalization of NK and dendritic cell subsets into inflamed tissues." Blood **109**(9): 3625-32.
- Parrish-Novak, J., Dillon, S. R., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., Gross, J. A., Johnston, J., Madden, K., Xu, W., West, J., Schrader, S., Burkhead, S., Heipel, M., Brandt, C., Kuijper, J. L., Kramer, J., Conklin, D., Presnell, S. R., Berry, J., Shiota, F., Bort, S., Hambly, K., Mudri, S., Clegg, C., Moore, M., Grant, F.

- J., Lofton-Day, C., Gilbert, T., Rayond, F., Ching, A., Yao, L., Smith, D., Webster, P., Whitmore, T., Maurer, M., Kaushansky, K., Holly, R. D. and Foster, D. (2000). "Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function." *Nature* **408**(6808): 57-63.
- Peck, M. D., Spalding, P. B., Moffat, F. L., Jr., Han, T. and Jy, W. (2000). "Dietary olive oil enhances murine lymphocyte calcium uptake." *J Trauma* **49**(1): 109-14.
- Pedram, A., Razandi, M., Evinger, A. J., Lee, E. and Levin, E. R. (2009). "Estrogen inhibits ATR signaling to cell cycle checkpoints and DNA repair." *Mol Biol Cell* **20**(14): 3374-89.
- Pende, D., Biassoni, R., Cantoni, C., Verdiani, S., Falco, M., di Donato, C., Accame, L., Bottino, C., Moretta, A. and Moretta, L. (1996). "The natural killer cell receptor specific for HLA-A allotypes: a novel member of the p58/p70 family of inhibitory receptors that is characterized by three immunoglobulin-like domains and is expressed as a 140-kD disulphide-linked dimer." *J Exp Med* **184**(2): 505-18.
- Pende, D., Parolini, S., Pessino, A., Sivori, S., Augugliaro, R., Morelli, L., Marcenaro, E., Accame, L., Malaspina, A., Biassoni, R., Bottino, C., Moretta, L. and Moretta, A. (1999). "Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells." *J Exp Med* **190**(10): 1505-16.
- Pende, D., Castriconi, R., Romagnani, P., Spaggiari, G. M., Marcenaro, S., Dondero, A., Lazzeri, E., Lasagni, L., Martini, S., Rivera, P., Capobianco, A., Moretta, L., Moretta, A. and Bottino, C. (2006). "Expression of the DNAM-1 ligands, Nectin-2 (CD112) and poliovirus receptor (CD155), on dendritic cells: relevance for natural killer-dendritic cell interaction." *Blood* **107**(5): 2030-6.
- Pereg, D. and Lishner, M. (2005). "Non-steroidal anti-inflammatory drugs for the prevention and treatment of cancer." *J Intern Med* **258**(2): 115-23.
- Perez, S. A., Mahaira, L. G., Sotiropoulou, P. A., Gritzapis, A. D., Iliopoulou, E. G., Niarchos, D. K., Cacoullos, N. T., Kavalakis, Y. G., Antsaklis, A. I., Sotiriadou, N. N., Baxevas, C. N. and Papamichail, M. (2006). "Effect of IL-21 on NK cells derived from different umbilical cord blood populations." *Int Immunol* **18**(1): 49-58.
- Pericle, F., Kirken, R. A., Bronte, V., Sconocchia, G., DaSilva, L. and Segal, D. M. (1997). "Immunocompromised tumor-bearing mice show a selective loss of STAT5a/b expression in T and B lymphocytes." *J Immunol* **159**(6): 2580-5.
- Peritt, D., Robertson, S., Gri, G., Showe, L., Aste-Amezaga, M. and Trinchieri, G. (1998). "Differentiation of human NK cells into NK1 and NK2 subsets." *J Immunol* **161**(11): 5821-4.
- Perrotta, C., Falcone, S., Capobianco, A., Camporeale, A., Sciorati, C., De Palma, C., Pisconti, A., Rovere-Querini, P., Bellone, M., Manfredi, A. A. and Clementi, E. (2004). "Nitric oxide confers therapeutic activity to dendritic cells in a mouse model of melanoma." *Cancer Res* **64**(11): 3767-71.
- Pessino, A., Sivori, S., Bottino, C., Malaspina, A., Morelli, L., Moretta, L., Biassoni, R. and Moretta, A. (1998). "Molecular cloning of NKp46: a novel member of the immunoglobulin superfamily involved in triggering of natural cytotoxicity." *J Exp Med* **188**(5): 953-60.
- Pestka, S., Krause, C. D., Sarkar, D., Walter, M. R., Shi, Y. and Fisher, P. B. (2004). "Interleukin-10 and related cytokines and receptors." *Annu Rev Immunol* **22**: 929-79.
- Peters, J. M., Aoyama, T., Cattley, R. C., Nobumitsu, U., Hashimoto, T. and Gonzalez, F. J. (1998). "Role of peroxisome proliferator-activated receptor alpha in altered cell cycle regulation in mouse liver." *Carcinogenesis* **19**(11): 1989-94.
- Peterson, L. D., Jeffery, N. M., Thies, F., Sanderson, P., Newsholme, E. A. and Calder, P. C. (1998). "Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocyte fatty acid composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity." *Lipids* **33**(2): 171-80.
- Phillips, J. H., Le, A. M. and Lanier, L. L. (1984). "Natural killer cells activated in a human mixed lymphocyte response culture identified by expression of Leu-11 and class II histocompatibility antigens." *J Exp Med* **159**(4): 993-1008.
- Piccioli, D., Sbrana, S., Melandri, E. and Valiante, N. M. (2002). "Contact-dependent stimulation and inhibition of dendritic cells by natural killer cells." *J Exp Med* **195**(3): 335-41.
- Pierdominici, M., Maselli, A., Colasanti, T., Giammarioli, A. M., Delunardo, F., Vacirca, D., Sanchez, M., Giovannetti, A., Malorni, W. and Ortona, E. (2010). "Estrogen receptor profiles in human peripheral blood lymphocytes." *Immunol Lett* **132**(1-2): 79-85.
- Pinkoski, M. J., Waterhouse, N. J., Heibei, J. A., Wolf, B. B., Kuwana, T., Goldstein, J. C., Newmeyer, D. D., Bleackley, R. C. and Green, D. R. (2001). "Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway." *J Biol Chem* **276**(15): 12060-7.
- Plougastel, B. and Trowsdale, J. (1997). "Cloning of NKG2-F, a new member of the NKG2 family of human natural killer cell receptor genes." *Eur J Immunol* **27**(11): 2835-9.

- Plougastel, B. and Trowsdale, J. (1998). "Sequence analysis of a 62-kb region overlapping the human KLRC cluster of genes." *Genomics* **49**(2): 193-9.
 - Pockaj, B. A., Basu, G. D., Pathangey, L. B., Gray, R. J., Hernandez, J. L., Gendler, S. J. and Mukherjee, P. (2004). "Reduced T-cell and dendritic cell function is related to cyclooxygenase-2 overexpression and prostaglandin E2 secretion in patients with breast cancer." *Ann Surg Oncol* **11**(3): 328-39.
 - Pogge von Strandmann, E., Simhadri, V. R., von Tresckow, B., Sasse, S., Reiners, K. S., Hansen, H. P., Rothe, A., Boll, B., Simhadri, V. L., Borchmann, P., McKinnon, P. J., Hallek, M. and Engert, A. (2007). "Human leukocyte antigen-B-associated transcript 3 is released from tumor cells and engages the NKp30 receptor on natural killer cells." *Immunity* **27**(6): 965-74.
 - Pollard, J. W. (2004). "Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis." *Nat Rev Cancer* **4**(1): 71-8.
 - Ponassi, M., Cantoni, C., Biassoni, R., Conte, R., Spallarossa, A., Pesce, A., Moretta, A., Moretta, L., Bolognesi, M. and Bordo, D. (2003). "Structure of the human NK cell triggering receptor NKp46 ectodomain." *Biochem Biophys Res Commun* **309**(2): 317-23.
 - Ponte, M., Cantoni, C., Biassoni, R., Tradori-Cappai, A., Bentivoglio, G., Vitale, C., Bertone, S., Moretta, A., Moretta, L. and Mingari, M. C. (1999). "Inhibitory receptors sensing HLA-G1 molecules in pregnancy: decidua-associated natural killer cells express LIR-1 and CD94/NKG2A and acquire p49, an HLA-G1-specific receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(10): 5674-9.
 - Portielje, J. E., Lamers, C. H., Kruit, W. H., Sparreboom, A., Bolhuis, R. L., Stoter, G., Huber, C. and Gratama, J. W. (2003). "Repeated administrations of interleukin (IL)-12 are associated with persistently elevated plasma levels of IL-10 and declining IFN-gamma, tumor necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-8 responses." *Clin Cancer Res* **9**(1): 76-83.
 - Poupot, M. and Fournie, J. J. (2004). "Non-peptide antigens activating human Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes." *Immunol Lett* **95**(2): 129-38.
 - Presky, D. H., Yang, H., Minetti, L. J., Chua, A. O., Nabavi, N., Wu, C. Y., Gately, M. K. and Gubler, U. (1996). "A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(24): 14002-7.
 - Procaccini, C., De Rosa, V., Galgani, M., Abanni, L., Cali, G., Porcellini, A., Carbone, F., Fontana, S., Horvath, T. L., La Cava, A. and Matarese, G. (2010). "An oscillatory switch in mTOR kinase activity sets regulatory T cell responsiveness." *Immunity* **33**(6): 929-41.
 - Prod'homme, V., Griffin, C., Aicheler, R. J., Wang, E. C., McSharry, B. P., Rickards, C. R., Stanton, R. J., Borysiewicz, L. K., Lopez-Botet, M., Wilkinson, G. W. and Tomasec, P. (2007). "The human cytomegalovirus MHC class I homolog UL18 inhibits LIR-1+ but activates LIR-1- NK cells." *J Immunol* **178**(7): 4473-81.
 - Purasiri, P., McKechnie, A., Heys, S. D. and Eremin, O. (1997). "Modulation in vitro of human natural cytotoxicity, lymphocyte proliferative response to mitogens and cytokine production by essential fatty acids." *Immunology* **92**(2): 166-72.
 - Purdy, A. K. and Campbell, K. S. (2009). "Natural killer cells and cancer: regulation by the killer cell Ig-like receptors (KIR)." *Cancer Biol Ther* **8**(23): 2211-20.
 - Purohit, A., Newman, S. P. and Reed, M. J. (2002). "The role of cytokines in regulating estrogen synthesis: implications for the etiology of breast cancer." *Breast Cancer Res* **4**(2): 65-9.
- Q-
- Quaedackers, M. E., van den Brink, C. E., van der Saag, P. T. and Tertoolen, L. G. (2007). "Direct interaction between estrogen receptor alpha and NF-kappaB in the nucleus of living cells." *Mol Cell Endocrinol* **273**(1-2): 42-50.
- R-
- Rabinovich, B., Li, J., Wolfson, M., Lawrence, W., Beers, C., Chalupny, J., Hurren, R., Greenfield, B., Miller, R. and Cosman, D. (2006). "NKG2D splice variants: a reexamination of adaptor molecule associations." *Immunogenetics* **58**(2-3): 81-8.
 - Radi, R. (2004). "Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(12): 4003-8.
 - Rahman, M., Pumphrey, J. G. and Lipkowitz, S. (2009). "The TRAIL to targeted therapy of breast cancer." *Adv Cancer Res* **103**: 43-73.
 - Rajagopalan, S. and Long, E. O. (1999). "A human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G-specific receptor expressed on all natural killer cells." *J Exp Med* **189**(7): 1093-100.
 - Rajagopalan, S., Fu, J. and Long, E. O. (2001). "Cutting edge: induction of IFN-gamma production but not cytotoxicity by the killer cell Ig-like receptor KIR2DL4 (CD158d) in resting NK cells." *J Immunol* **167**(4): 1877-81.

- Ramoni, C., Luciani, F., Spadaro, F., Lugini, L., Lozupone, F. and Fais, S. (2002). "Differential expression and distribution of ezrin, radixin and moesin in human natural killer cells." *Eur J Immunol* **32**(11): 3059-65.
- Raso, G. M., Pacilio, M., Esposito, E., Coppola, A., Di Carlo, R. and Meli, R. (2002). "Leptin potentiates IFN-gamma-induced expression of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2 in murine macrophage J774A.1." *Br J Pharmacol* **137**(6): 799-804.
- Raulet, D. H. (2003). "Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands." *Nat Rev Immunol* **3**(10): 781-90.
- Raulet, D. H. and Vance, R. E. (2006). "Self-tolerance of natural killer cells." *Nat Rev Immunol* **6**(7): 520-31.
- Razandi, M., Pedram, A., Merchenthaler, I., Greene, G. L. and Levin, E. R. (2004). "Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers." *Mol Endocrinol* **18**(12): 2854-65.
- Reeves, G. K., Pirie, K., Beral, V., Green, J., Spencer, E. and Bull, D. (2007). "Cancer incidence and mortality in relation to body mass index in the Million Women Study: cohort study." *BMJ* **335**(7630): 1134.
- Renehan, A. G., Harvie, M. and Howell, A. (2006). "Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and breast cancer risk: eight years on." *Endocr Relat Cancer* **13**(2): 273-8.
- Renehan, A. G., Tyson, M., Egger, M., Heller, R. F. and Zwahlen, M. (2008). "Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies." *Lancet* **371**(9612): 569-78.
- Renier, G., Clement, I., Desfaits, A. C. and Lambert, A. (1996). "Direct stimulatory effect of insulin-like growth factor-I on monocyte and macrophage tumor necrosis factor-alpha production." *Endocrinology* **137**(11): 4611-8.
- Revy, P., Buck, D., le Deist, F. and de Villartay, J. P. (2005). "The repair of DNA damages/modifications during the maturation of the immune system: lessons from human primary immunodeficiency disorders and animal models." *Adv Immunol* **87**: 237-95.
- Reyburn, H. T., Mandelboim, O., Vales-Gomez, M., Davis, D. M., Pazmany, L. and Strominger, J. L. (1997). "The class I MHC homologue of human cytomegalovirus inhibits attack by natural killer cells." *Nature* **386**(6624): 514-7.
- Rincon-Orozco, B., Kunzmann, V., Wrobel, P., Kabelitz, D., Steinle, A. and Herrmann, T. (2005). "Activation of V gamma 9V delta 2 T cells by NKG2D." *J Immunol* **175**(4): 2144-51.
- Riteau, B., Menier, C., Khalil-Daher, I., Martinuzzi, S., Pla, M., Dausset, J., Carosella, E. D. and Rouas-Freiss, N. (2001). "HLA-G1 co-expression boosts the HLA class I-mediated NK lysis inhibition." *Int Immunol* **13**(2): 193-201.
- Roberts, A. I., Lee, L., Schwarz, E., Groh, V., Spies, T., Ebert, E. C. and Jabri, B. (2001). "NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment." *J Immunol* **167**(10): 5527-30.
- Roberts, D. L., Dive, C. and Renehan, A. G. (2010). "Biological mechanisms linking obesity and cancer risk: new perspectives." *Annu Rev Med* **61**: 301-16.
- Roca, H., Varsos, Z. S., Sud, S., Craig, M. J., Ying, C. and Pienta, K. J. (2009). "CCL2 and interleukin-6 promote survival of human CD11b+ peripheral blood mononuclear cells and induce M2-type macrophage polarization." *J Biol Chem* **284**(49): 34342-54.
- Rodriguez-Pinto, D. (2005). "B cells as antigen presenting cells." *Cell Immunol* **238**(2): 67-75.
- Rodriguez, P. C., Zea, A. H., Culotta, K. S., Zabaleta, J., Ochoa, J. B. and Ochoa, A. C. (2002). "Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine." *J Biol Chem* **277**(24): 21123-9.
- Rodriguez, P. C., Zea, A. H. and Ochoa, A. C. (2003). "Mechanisms of tumor evasion from the immune response." *Cancer Chemother Biol Response Modif* **21**: 351-64.
- Rodriguez, P. C., Quiceno, D. G., Zabaleta, J., Ortiz, B., Zea, A. H., Piazuelo, M. B., Delgado, A., Correa, P., Brayer, J., Sotomayor, E. M., Antonia, S., Ochoa, J. B. and Ochoa, A. C. (2004). "Arginase I production in the tumor microenvironment by mature myeloid cells inhibits T-cell receptor expression and antigen-specific T-cell responses." *Cancer Res* **64**(16): 5839-49.
- Rodriguez, P. C., Hernandez, C. P., Quiceno, D., Dubinett, S. M., Zabaleta, J., Ochoa, J. B., Gilbert, J. and Ochoa, A. C. (2005). "Arginase I in myeloid suppressor cells is induced by COX-2 in lung carcinoma." *J Exp Med* **202**(7): 931-9.
- Rodriguez, P. C. and Ochoa, A. C. (2006). "T cell dysfunction in cancer: role of myeloid cells and tumor cells regulating amino acid availability and oxidative stress." *Semin Cancer Biol* **16**(1): 66-72.
- Rodriguez, P. C., Quiceno, D. G. and Ochoa, A. C. (2007). "L-arginine availability regulates T-lymphocyte cell-cycle progression." *Blood* **109**(4): 1568-73.
- Rodriguez, P. C. and Ochoa, A. C. (2008). "Arginine regulation by myeloid derived suppressor cells and tolerance in cancer: mechanisms and therapeutic perspectives." *Immunol Rev* **222**: 180-91.
- Roger, P., Sahla, M. E., Akela, S., Gustafsson, J. A., Baldet, P. and Rochefort, H. (2001). "Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors." *Cancer Res* **61**(6): 2537-41.

- Rogers, P. R., Song, J., Gramaglia, I., Killeen, N. and Croft, M. (2001). "OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells." *Immunity* **15**(3): 445-55.
- Rohde, J., Heitman, J. and Cardenas, M. E. (2001). "The TOR kinases link nutrient sensing to cell growth." *J Biol Chem* **276**(13): 9583-6.
- Romagnani, C., Della Chiesa, M., Kohler, S., Moewes, B., Radbruch, A., Moretta, L., Moretta, A. and Thiel, A. (2005). "Activation of human NK cells by plasmacytoid dendritic cells and its modulation by CD4+ T helper cells and CD4+ CD25hi T regulatory cells." *Eur J Immunol* **35**(8): 2452-8.
- Romagnani, C., Juelke, K., Falco, M., Morandi, B., D'Agostino, A., Costa, R., Ratto, G., Forte, G., Carrega, P., Lui, G., Conte, R., Strowig, T., Moretta, A., Munz, C., Thiel, A., Moretta, L. and Ferlazzo, G. (2007). "CD56brightCD16- killer Ig-like receptor- NK cells display longer telomeres and acquire features of CD56dim NK cells upon activation." *J Immunol* **178**(8): 4947-55.
- Romagnani, S. (1995). "Biology of human TH1 and TH2 cells." *J Clin Immunol* **15**(3): 121-9.
- Romagnani, S. (1997). "The Th1/Th2 paradigm." *Immunol Today* **18**(6): 263-6.
- Romagnani, S. (1999). "Th1/Th2 cells." *Inflamm Bowel Dis* **5**(4): 285-94.
- Romagne, F., Andre, P., Spee, P., Zahn, S., Anfossi, N., Gauthier, L., Capanni, M., Ruggeri, L., Benson, D. M., Jr., Blaser, B. W., Della Chiesa, M., Moretta, A., Vivier, E., Caligiuri, M. A., Velardi, A. and Wagtmann, N. (2009). "Preclinical characterization of 1-7F9, a novel human anti-KIR receptor therapeutic antibody that augments natural killer-mediated killing of tumor cells." *Blood* **114**(13): 2667-77.
- Roncarolo, M. G., Bigler, M., Haanen, J. B., Yssel, H., Bacchetta, R., de Vries, J. E. and Spits, H. (1991). "Natural killer cell clones can efficiently process and present protein antigens." *J Immunol* **147**(3): 781-7.
- Rose, D. P., Connolly, J. M. and Meschter, C. L. (1991). "Effect of dietary fat on human breast cancer growth and lung metastasis in nude mice." *J Natl Cancer Inst* **83**(20): 1491-5.
- Rose, D. P., Connolly, J. M. and Liu, X. H. (1994). "Effects of linoleic acid on the growth and metastasis of two human breast cancer cell lines in nude mice and the invasive capacity of these cell lines in vitro." *Cancer Res* **54**(24): 6557-62.
- Rose, D. P., Connolly, J. M., Rayburn, J. and Coleman, M. (1995). "Influence of diets containing eicosapentaenoic or docosahexaenoic acid on growth and metastasis of breast cancer cells in nude mice." *J Natl Cancer Inst* **87**(8): 587-92.
- Rosen, D. B., Araki, M., Hamerman, J. A., Chen, T., Yamamura, T. and Lanier, L. L. (2004). "A Structural basis for the association of DAP12 with mouse, but not human, NKG2D." *J Immunol* **173**(4): 2470-8.
- Rosenstein, M., Ettinghausen, S. E. and Rosenberg, S. A. (1986). "Extravasation of intravascular fluid mediated by the systemic administration of recombinant interleukin 2." *J Immunol* **137**(5): 1735-42.
- Rosental, B., Brusilovsky, M., Hadad, U., Oz, D., Appel, M. Y., Afergan, F., Yossef, R., Rosenberg, L. A., Aharoni, A., Cerwenka, A., Campbell, K. S., Braiman, A. and Porgador, A. (2011). "Proliferating cell nuclear antigen is a novel inhibitory ligand for the natural cytotoxicity receptor Nkp44." *J Immunol* **187**(11): 5693-702.
- Rouillier, P., Senesse, P., Cottet, V., Valteau, A., Faivre, J. and Boutron-Ruault, M. C. (2005). "Dietary patterns and the adenomacarcinoma sequence of colorectal cancer." *Eur J Nutr* **44**(5): 311-8.
- Ruhl, C. E. and Everhart, J. E. (2001). "Leptin concentrations in the United States: relations with demographic and anthropometric measures." *Am J Clin Nutr* **74**(3): 295-301.
- Ruiz-Cabello, F. and Garrido, F. (1998). "HLA and cancer: from research to clinical impact." *Immunol Today* **19**(12): 539-42.
- Ruiz-Ruiz, C., Munoz-Pinedo, C. and Lopez-Rivas, A. (2000). "Interferon-gamma treatment elevates caspase-8 expression and sensitizes human breast tumor cells to a death receptor-induced mitochondria-operated apoptotic program." *Cancer Res* **60**(20): 5673-80.
- Ruiz-Ruiz, M. C. and Lopez-Rivas, A. (1999). "p53-mediated up-regulation of CD95 is not involved in genotoxic drug-induced apoptosis of human breast tumor cells." *Cell Death Differ* **6**(3): 271-80.
- Russell, J. H. and Ley, T. J. (2002). "Lymphocyte-mediated cytotoxicity." *Annu Rev Immunol* **20**: 323-70.
- Russo, J., Ao, X., Grill, C. and Russo, I. H. (1999). "Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor alpha and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland." *Breast Cancer Res Treat* **53**(3): 217-27.
- Ryffel, B. (1997). "Interleukin-12: role of interferon-gamma in IL-12 adverse effects." *Clin Immunol Immunopathol* **83**(1): 18-20.

-S-

- Saad, M. F., Damani, S., Gingerich, R. L., Riad-Gabriel, M. G., Khan, A., Boyadjian, R., Jinagouda, S. D., el-Tawil, K., Rude, R. K. and Kamdar, V. (1997). "Sexual dimorphism in plasma leptin concentration." *J Clin Endocrinol Metab* **82**(2): 579-84.

- Sachdev, D. and Yee, D. (2001). "The IGF system and breast cancer." *Endocr Relat Cancer* **8**(3): 197-209.
- Saigusa, S., Ichikura, T., Tsujimoto, H., Sugawara, H., Majima, T., Kawarabayashi, N., Chochi, K., Ono, S., Kinoshita, M., Seki, S., Ogawa, K. and Mochizuki, H. (2007). "Serum granulysin level as a novel prognostic marker in patients with gastric carcinoma." *J Gastroenterol Hepatol* **22**(8): 1322-7.
- Saito, H., Tsujitani, S., Ikeguchi, M., Maeta, M. and Kaibara, N. (1998). "Relationship between the expression of vascular endothelial growth factor and the density of dendritic cells in gastric adenocarcinoma tissue." *Br J Cancer* **78**(12): 1573-7.
- Sakahira, H., Enari, M. and Nagata, S. (1998). "Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis." *Nature* **391**(6662): 96-9.
- Salcedo, T. W., Kurosaki, T., Kanakaraj, P., Ravetch, J. V. and Perussia, B. (1993). "Physical and functional association of p56lck with Fc gamma RIIIA (CD16) in natural killer cells." *J Exp Med* **177**(5): 1475-80.
- Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1999). "Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation." *J Exp Med* **189**(4): 611-4.
- Sallusto, F., Geginat, J. and Lanzavecchia, A. (2004). "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance." *Annu Rev Immunol* **22**: 745-63.
- Salvucci, O., Kolb, J. P., Dugas, B., Dugas, N. and Chouaib, S. (1998). "The induction of nitric oxide by interleukin-12 and tumor necrosis factor-alpha in human natural killer cells: relationship with the regulation of lytic activity." *Blood* **92**(6): 2093-102.
- Sancho, D., Nieto, M., Llano, M., Rodriguez-Fernandez, J. L., Tejedor, R., Avraham, S., Cabanas, C., Lopez-Botet, M. and Sanchez-Madrid, F. (2000). "The tyrosine kinase PYK-2/RAFTK regulates natural killer (NK) cell cytotoxic response, and is translocated and activated upon specific target cell recognition and killing." *J Cell Biol* **149**(6): 1249-62.
- Sanderson, P., MacPherson, G. G., Jenkins, C. H. and Calder, P. C. (1997). "Dietary fish oil diminishes the antigen presentation activity of rat dendritic cells." *J Leukoc Biol* **62**(6): 771-7.
- Sanderson, P. and Calder, P. C. (1998). "Dietary fish oil appears to prevent the activation of phospholipase C-gamma in lymphocytes." *Biochim Biophys Acta* **1392**(2-3): 300-8.
- Sandusky, M. M., Messmer, B. and Watzl, C. (2006). "Regulation of 2B4 (CD244)-mediated NK cell activation by ligand-induced receptor modulation." *Eur J Immunol* **36**(12): 3268-76.
- Sanjanwala, B., Draghi, M., Norman, P. J., Guethlein, L. A. and Parham, P. (2008). "Polymorphic sites away from the Bw4 epitope that affect interaction of Bw4+ HLA-B with KIR3DL1." *J Immunol* **181**(9): 6293-300.
- Santos-Alvarez, J., Goberna, R. and Sanchez-Margalet, V. (1999). "Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes." *Cell Immunol* **194**(1): 6-11.
- Sareneva, T., Julkunen, I. and Matikainen, S. (2000). "IFN-alpha and IL-12 induce IL-18 receptor gene expression in human NK and T cells." *J Immunol* **165**(4): 1933-8.
- Sato, K., Hida, S., Takayanagi, H., Yokochi, T., Kayagaki, N., Takeda, K., Yagita, H., Okumura, K., Tanaka, N., Taniguchi, T. and Ogasawara, K. (2001). "Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta." *Eur J Immunol* **31**(11): 3138-46.
- Sato Mito, N., Suzui, M., Yoshino, H., Kaburagi, T. and Sato, K. (2009). "Long term effects of high fat and sucrose diets on obesity and lymphocyte proliferation in mice." *J Nutr Health Aging* **13**(7): 602-6.
- Sauer, H., Pratsch, L., Tschopp, J., Bhakdi, S. and Peters, R. (1991). "Functional size of complement and perforin pores compared by confocal laser scanning microscopy and fluorescence microphotolysis." *Biochim Biophys Acta* **1063**(1): 137-46.
- Sauer, H., Wartenberg, M. and Hescheler, J. (2001). "Reactive oxygen species as intracellular messengers during cell growth and differentiation." *Cell Physiol Biochem* **11**(4): 173-86.
- Sauve, K., Lepage, J., Sanchez, M., Heveker, N. and Tremblay, A. (2009). "Positive feedback activation of estrogen receptors by the CXCL12-CXCR4 pathway." *Cancer Res* **69**(14): 5793-800.
- Saxena, N. K., Vertino, P. M., Anania, F. A. and Sharma, D. (2007). "leptin-induced growth stimulation of breast cancer cells involves recruitment of histone acetyltransferases and mediator complex to CYCLIN D1 promoter via activation of Stat3." *J Biol Chem* **282**(18): 13316-25.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H. and Peter, M. E. (1998). "Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways." *EMBO J* **17**(6): 1675-87.
- Scanga, C. B., Verde, T. J., Paolone, A. M., Andersen, R. E. and Wadden, T. A. (1998). "Effects of weight loss and exercise training on natural killer cell activity in obese women." *Med Sci Sports Exerc* **30**(12): 1666-71.
- Schaffler, A., Scholmerich, J. and Buechler, C. (2007). "Mechanisms of disease: adipokines and breast cancer - endocrine and paracrine mechanisms that connect adiposity and breast cancer." *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* **3**(4): 345-54.

- Schattner, E. J., Mascarenhas, J., Bishop, J., Yoo, D. H., Chadburn, A., Crow, M. K. and Friedman, S. M. (1996). "CD4+ T-cell induction of Fas-mediated apoptosis in Burkitt's lymphoma B cells." *Blood* **88**(4): 1375-82.
- Schmidt, E. B., Varming, K., Pedersen, J. O., Lervang, H. H., Grunnet, N., Jersild, C. and Dyerberg, J. (1992). "Long-term supplementation with n-3 fatty acids, II: Effect on neutrophil and monocyte chemotaxis." *Scand J Clin Lab Invest* **52**(3): 229-36.
- Schmidt, E. B., Varming, K., Moller, J. M., Bulow Pedersen, I., Madsen, P. and Dyerberg, J. (1996). "No effect of a very low dose of n-3 fatty acids on monocyte function in healthy humans." *Scand J Clin Lab Invest* **56**(1): 87-92.
- Schmidt, H., Brown, J., Mouritzen, U., Selby, P., Fode, K., Svane, I. M., Cook, G. P., Mollerup, D. H. and Geertsen, P. F. (2010). "Safety and clinical effect of subcutaneous human interleukin-21 in patients with metastatic melanoma or renal cell carcinoma: a phase I trial." *Clin Cancer Res* **16**(21): 5312-9.
- Schmielau, J. and Finn, O. J. (2001). "Activated granulocytes and granulocyte-derived hydrogen peroxide are the underlying mechanism of suppression of t-cell function in advanced cancer patients." *Cancer Res* **61**(12): 4756-60.
- Schopfer, F. J., Baker, P. R. and Freeman, B. A. (2003). "NO-dependent protein nitration: a cell signaling event or an oxidative inflammatory response?" *Trends Biochem Sci* **28**(12): 646-54.
- Schreiber, R. D., Old, L. J. and Smyth, M. J. (2011). "Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion." *Science* **331**(6024): 1565-70.
- Screpanti, V., Wallin, R. P., Ljunggren, H. G. and Grandien, A. (2001). "A central role for death receptor-mediated apoptosis in the rejection of tumors by NK cells." *J Immunol* **167**(4): 2068-73.
- Seder, R. A. and Ahmed, R. (2003). "Similarities and differences in CD4+ and CD8+ effector and memory T cell generation." *Nat Immunol* **4**(9): 835-42.
- Seliger, B., Cabrera, T., Garrido, F. and Ferrone, S. (2002). "HLA class I antigen abnormalities and immune escape by malignant cells." *Semin Cancer Biol* **12**(1): 3-13.
- Semenza, G. L. (2001). "HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing." *Curr Opin Cell Biol* **13**(2): 167-71.
- Semenza, G. L. (2003). "Targeting HIF-1 for cancer therapy." *Nat Rev Cancer* **3**(10): 721-32.
- Serafini, P., Carbley, R., Noonan, K. A., Tan, G., Bronte, V. and Borrello, I. (2004). "High-dose granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-producing vaccines impair the immune response through the recruitment of myeloid suppressor cells." *Cancer Res* **64**(17): 6337-43.
- Serafini, P., Borrello, I. and Bronte, V. (2006). "Myeloid suppressor cells in cancer: recruitment, phenotype, properties, and mechanisms of immune suppression." *Semin Cancer Biol* **16**(1): 53-65.
- Shaikh, S. R. and Edidin, M. (2007). "Immunosuppressive effects of polyunsaturated fatty acids on antigen presentation by human leukocyte antigen class I molecules." *J Lipid Res* **48**(1): 127-38.
- Sharma, A., Trivedi, N. R., Zimmerman, M. A., Tuveson, D. A., Smith, C. D. and Robertson, G. P. (2005). "Mutant V599EB-Raf regulates growth and vascular development of malignant melanoma tumors." *Cancer Res* **65**(6): 2412-21.
- Sharma, M. D., Baban, B., Chandler, P., Hou, D. Y., Singh, N., Yagita, H., Azuma, M., Blazar, B. R., Mellor, A. L. and Munn, D. H. (2007). "Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase." *J Clin Invest* **117**(9): 2570-82.
- Sharpe, A. H. and Freeman, G. J. (2002). "The B7-CD28 superfamily." *Nat Rev Immunol* **2**(2): 116-26.
- Shaw, A. S. and Dustin, M. L. (1997). "Making the T cell receptor go the distance: a topological view of T cell activation." *Immunity* **6**(4): 361-9.
- Sheng, H., Shao, J., Morrow, J. D., Beauchamp, R. D. and DuBois, R. N. (1998). "Modulation of apoptosis and Bcl-2 expression by prostaglandin E2 in human colon cancer cells." *Cancer Res* **58**(2): 362-6.
- Shevach, E. M. (2009). "Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression." *Immunity* **30**(5): 636-45.
- Shi, Q., Xiong, Q., Wang, B., Le, X., Khan, N. A. and Xie, K. (2000). "Influence of nitric oxide synthase II gene disruption on tumor growth and metastasis." *Cancer Res* **60**(10): 2579-83.
- Shi, Y. and Massague, J. (2003). "Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus." *Cell* **113**(6): 685-700.
- Shilling, H. G., Young, N., Guethlein, L. A., Cheng, N. W., Gardiner, C. M., Tyan, D. and Parham, P. (2002). "Genetic control of human NK cell repertoire." *J Immunol* **169**(1): 239-47.
- Shilling, H. G., McQueen, K. L., Cheng, N. W., Shizuru, J. A., Negrin, R. S. and Parham, P. (2003). "Reconstitution of NK cell receptor repertoire following HLA-matched hematopoietic cell transplantation." *Blood* **101**(9): 3730-40.
- Shimizu, J., Yamazaki, S. and Sakaguchi, S. (1999). "Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity." *J Immunol* **163**(10): 5211-8.

- Shin, M. S., Kim, H. S., Lee, S. H., Park, W. S., Kim, S. Y., Park, J. Y., Lee, J. H., Lee, S. K., Lee, S. N., Jung, S. S., Han, J. Y., Kim, H., Lee, J. Y. and Yoo, N. J. (2001). "Mutations of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand receptor 1 (TRAIL-R1) and receptor 2 (TRAIL-R2) genes in metastatic breast cancers." *Cancer Res* **61**(13): 4942-6.
- Shreedhar, V., Giese, T., Sung, V. W. and Ullrich, S. E. (1998). "A cytokine cascade including prostaglandin E2, IL-4, and IL-10 is responsible for UV-induced systemic immune suppression." *J Immunol* **160**(8): 3783-9.
- Shum, B. P., Flodin, L. R., Muir, D. G., Rajalingam, R., Khakoo, S. I., Cleland, S., Guethlein, L. A., Uhrberg, M. and Parham, P. (2002). "Conservation and variation in human and common chimpanzee CD94 and NKG2 genes." *J Immunol* **168**(1): 240-52.
- Sica, A., Saccani, A., Bottazzi, B., Polentarutti, N., Vecchi, A., van Damme, J. and Mantovani, A. (2000). "Autocrine production of IL-10 mediates defective IL-12 production and NF-kappa B activation in tumor-associated macrophages." *J Immunol* **164**(2): 762-7.
- Sica, A. (2010). "Role of tumour-associated macrophages in cancer-related inflammation." *Exp Oncol* **32**(3): 153-8.
- Siegal, F. P., Kadowaki, N., Shodell, M., Fitzgerald-Bocarsly, P. A., Shah, K., Ho, S., Antonenko, S. and Liu, Y. J. (1999). "The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood." *Science* **284**(5421): 1835-7.
- Simon, A. K., Jones, E., Richards, H., Wright, K., Betts, G., Godkin, A., Screaton, G. and Gallimore, A. (2007). "Regulatory T cells inhibit Fas ligand-induced innate and adaptive tumour immunity." *Eur J Immunol* **37**(3): 758-67.
- Simons, K. and Ikonen, E. (1997). "Functional rafts in cell membranes." *Nature* **387**(6633): 569-72.
- Simons, K. and Toomre, D. (2000). "Lipid rafts and signal transduction." *Nat Rev Mol Cell Biol* **1**(1): 31-9.
- Simopoulos, A. P. (2002). "The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids." *Biomed Pharmacother* **56**(8): 365-79.
- Simopoulos, A. P. (2006). "Evolutionary aspects of diet, the omega-6/omega-3 ratio and genetic variation: nutritional implications for chronic diseases." *Biomed Pharmacother* **60**(9): 502-7.
- Sims, T. N., Soos, T. J., Xenias, H. S., Dubin-Thaler, B., Hofman, J. M., Waite, J. C., Cameron, T. O., Thomas, V. K., Varma, R., Wiggins, C. H., Sheetz, M. P., Littman, D. R. and Dustin, M. L. (2007). "Opposing effects of PKC θ and WASp on symmetry breaking and relocation of the immunological synapse." *Cell* **129**(4): 773-85.
- Singh, R., Pervin, S., Karimi, A., Cederbaum, S. and Chaudhuri, G. (2000). "Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells." *Cancer Res* **60**(12): 3305-12.
- Sinha, P., Clements, V. K. and Ostrand-Rosenberg, S. (2005). "Reduction of myeloid-derived suppressor cells and induction of M1 macrophages facilitate the rejection of established metastatic disease." *J Immunol* **174**(2): 636-45.
- Sinha, P., Clements, V. K., Fulton, A. M. and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). "Prostaglandin E2 promotes tumor progression by inducing myeloid-derived suppressor cells." *Cancer Res* **67**(9): 4507-13.
- Siracusa, M. C., Overstreet, M. G., Housseau, F., Scott, A. L. and Klein, S. L. (2008). "17beta-estradiol alters the activity of conventional and IFN-producing killer dendritic cells." *J Immunol* **180**(3): 1423-31.
- Sivori, S., Vitale, M., Morelli, L., Sanseverino, L., Augugliaro, R., Bottino, C., Moretta, L. and Moretta, A. (1997). "p46, a novel natural killer cell-specific surface molecule that mediates cell activation." *J Exp Med* **186**(7): 1129-36.
- Sivori, S., Cantoni, C., Parolini, S., Marcenaro, E., Conte, R., Moretta, L. and Moretta, A. (2003). "IL-21 induces both rapid maturation of human CD34+ cell precursors towards NK cells and acquisition of surface killer Ig-like receptors." *Eur J Immunol* **33**(12): 3439-47.
- Smeltz, R. B., Chen, J., Hu-Li, J. and Shevach, E. M. (2001). "Regulation of interleukin (IL)-18 receptor alpha chain expression on CD4(+) T cells during T helper (Th)1/Th2 differentiation. Critical downregulatory role of IL-4." *J Exp Med* **194**(2): 143-53.
- Smith, A. G., Sheridan, P. A., Harp, J. B. and Beck, M. A. (2007). "Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus." *J Nutr* **137**(5): 1236-43.
- Smyth, M. J. and Ortaldo, J. R. (1993). "Mechanisms of cytotoxicity used by human peripheral blood CD4+ and CD8+ T cell subsets. The role of granule exocytosis." *J Immunol* **151**(2): 740-7.
- Smyth, M. J., Cretney, E., Takeda, K., Wiltout, R. H., Sedger, L. M., Kayagaki, N., Yagita, H. and Okumura, K. (2001a). "Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) contributes to interferon gamma-dependent natural killer cell protection from tumor metastasis." *J Exp Med* **193**(6): 661-70.
- Smyth, M. J., Crowe, N. Y. and Godfrey, D. I. (2001b). "NK cells and NKT cells collaborate in host protection from methylcholanthrene-induced fibrosarcoma." *Int Immunol* **13**(4): 459-63.

- Smyth, M. J., Takeda, K., Hayakawa, Y., Peschon, J. J., van den Brink, M. R. and Yagita, H. (2003). "Nature's TRAIL--on a path to cancer immunotherapy." *Immunity* **18**(1): 1-6.
- Smyth, M. J., Swann, J., Cretny, E., Zerafa, N., Yokoyama, W. M. and Hayakawa, Y. (2005). "NKG2D function protects the host from tumor initiation." *J Exp Med* **202**(5): 583-8.
- Smyth, M. J., Teng, M. W., Swann, J., Kyparissoudis, K., Godfrey, D. I. and Hayakawa, Y. (2006). "CD4+CD25+ T regulatory cells suppress NK cell-mediated immunotherapy of cancer." *J Immunol* **176**(3): 1582-7.
- Snipes, J. A., Kis, B., Shelness, G. S., Hewett, J. A. and Busija, D. W. (2005). "Cloning and characterization of cyclooxygenase-1b (putative cyclooxygenase-3) in rat." *J Pharmacol Exp Ther* **313**(2): 668-76.
- Sola, C., Andre, P., Lemmers, C., Fuseri, N., Bonnafous, C., Blery, M., Wagtmann, N. R., Romagne, F., Vivier, E. and Ugolini, S. (2009). "Genetic and antibody-mediated reprogramming of natural killer cell missing-self recognition in vivo." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(31): 12879-84.
- Somasundaram, R., Jacob, L., Swoboda, R., Caputo, L., Song, H., Basak, S., Monos, D., Peritt, D., Marincola, F., Cai, D., Birebent, B., Bloome, E., Kim, J., Berencsi, K., Mastrangelo, M. and Herlyn, D. (2002). "Inhibition of cytolytic T lymphocyte proliferation by autologous CD4+/CD25+ regulatory T cells in a colorectal carcinoma patient is mediated by transforming growth factor-beta." *Cancer Res* **62**(18): 5267-72.
- Somersalo, K., Carpen, O. and Saksela, E. (1994). "Stimulated natural killer cells secrete factors with chemotactic activity, including NAP-1/IL-8, which supports VLA-4- and VLA-5-mediated migration of T lymphocytes." *Eur J Immunol* **24**(12): 2957-65.
- Son, Y. I., Dallal, R. M., Mailliard, R. B., Egawa, S., Jonak, Z. L. and Lotze, M. T. (2001). "Interleukin-18 (IL-18) synergizes with IL-2 to enhance cytotoxicity, interferon-gamma production, and expansion of natural killer cells." *Cancer Res* **61**(3): 884-8.
- Song, H., Hur, D. Y., Kim, K. E., Park, H., Kim, T., Kim, C. W., Bang, S. and Cho, D. H. (2006). "IL-2/IL-18 prevent the down-modulation of NKG2D by TGF-beta in NK cells via the c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway." *Cell Immunol* **242**(1): 39-45.
- Soto-Guzman, A., Robledo, T., Lopez-Perez, M. and Salazar, E. P. (2008). "Oleic acid induces ERK1/2 activation and AP-1 DNA binding activity through a mechanism involving Src kinase and EGFR transactivation in breast cancer cells." *Mol Cell Endocrinol* **294**(1-2): 81-91.
- Soto-Guzman, A., Navarro-Tito, N., Castro-Sanchez, L., Martinez-Orozco, R. and Salazar, E. P. (2010). "Oleic acid promotes MMP-9 secretion and invasion in breast cancer cells." *Clin Exp Metastasis* **27**(7): 505-15.
- Sower, L. E., Kimpel, G. R., Hanna, W. and Froelich, C. J. (1996). "Extracellular activities of human granzymes. I. Granzyme A induces IL6 and IL8 production in fibroblast and epithelial cell lines." *Cell Immunol* **171**(1): 159-63.
- Soyland, E., Lea, T., Sandstad, B. and Drevon, A. (1994). "Dietary supplementation with very long-chain n-3 fatty acids in man decreases expression of the interleukin-2 receptor (CD25) on mitogen-stimulated lymphocytes from patients with inflammatory skin diseases." *Eur J Clin Invest* **24**(4): 236-42.
- Speiser, D. E., Pittet, M. J., Valmori, D., Dunbar, R., Rimoldi, D., Lienard, D., MacDonald, H. R., Cerottini, J. C., Cerundolo, V. and Romero, P. (1999). "In vivo expression of natural killer cell inhibitory receptors by human melanoma-specific cytolytic T lymphocytes." *J Exp Med* **190**(6): 775-82.
- Spinella, F., Rosano, L., Di Castro, V., Natali, P. G. and Bagnato, A. (2004). "Endothelin-1-induced prostaglandin E2-EP2, EP4 signaling regulates vascular endothelial growth factor production and ovarian carcinoma cell invasion." *J Biol Chem* **279**(45): 46700-5.
- Sredni, B., Weil, M., Khomenok, G., Leberthal, I., Teitz, S., Mardor, Y., Ram, Z., Orenstein, A., Kershenovich, A., Michowiz, S., Cohen, Y. I., Rappaport, Z. H., Freidkin, I., Albeck, M., Longo, D. L. and Kalechman, Y. (2004). "Ammonium trichloro(dioxoethylene-o,o')tellurate (AS101) sensitizes tumors to chemotherapy by inhibiting the tumor interleukin 10 autocrine loop." *Cancer Res* **64**(5): 1843-52.
- Stahls, A., Liwszyc, G. E., Couture, C., Mustelin, T. and Andersson, L. C. (1994). "Triggering of human natural killer cells through CD16 induces tyrosine phosphorylation of the p72syk kinase." *Eur J Immunol* **24**(10): 2491-6.
- Stander, M., Naumann, U., Dumitrescu, L., Heneka, M., Loschmann, P., Gulbins, E., Dichgans, J. and Weller, M. (1998). "Decorin gene transfer-mediated suppression of TGF-beta synthesis abrogates experimental malignant glioma growth in vivo." *Gene Ther* **5**(9): 1187-94.
- Steinbrink, K., Jonuleit, H., Muller, G., Schuler, G., Knop, J. and Enk, A. H. (1999). "Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells." *Blood* **93**(5): 1634-42.

- Steinman, R. M., Hawiger, D., Liu, K., Bonifaz, L., Bonnyay, D., Mahnke, K., Iyoda, T., Ravetch, J., Dhodapkar, M., Inaba, K. and Nussenzweig, M. (2003). "Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance." Ann N Y Acad Sci **987**: 15-25.
 - Stephenson, G. D. and Rose, D. P. (2003). "Breast cancer and obesity: an update." Nutr Cancer **45**(1): 1-16.
 - Stewart, A. J., Westley, B. R. and May, F. E. (1992). "Modulation of the proliferative response of breast cancer cells to growth factors by oestrogen." Br J Cancer **66**(4): 640-8.
 - Stewart, C. A., Laugier-Anfossi, F., Vely, F., Saulquin, X., Riedmuller, J., Tisserant, A., Gauthier, L., Romagne, F., Ferracci, G., Arosa, F. A., Moretta, A., Sun, P. D., Ugolini, S. and Vivier, E. (2005). "Recognition of peptide-MHC class I complexes by activating killer immunoglobulin-like receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(37): 13224-9.
 - Stoitzner, P., Green, L. K., Jung, J. Y., Price, K. M., Atarea, H., Kivell, B. and Ronchese, F. (2008). "Inefficient presentation of tumor-derived antigen by tumor-infiltrating dendritic cells." Cancer Immunol Immunother **57**(11): 1665-73.
 - Stolina, M., Sharma, S., Lin, Y., Dohadwala, M., Gardner, B., Luo, J., Zhu, L., Kronenberg, M., Miller, P. W., Portanova, J., Lee, J. C. and Dubinett, S. M. (2000). "Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis." J Immunol **164**(1): 361-70.
 - Strand, S., Hofmann, W. J., Hug, H., Muller, M., Otto, G., Strand, D., Mariani, S. M., Stremmel, W., Krammer, P. H. and Galle, P. R. (1996). "Lymphocyte apoptosis induced by CD95 (APO-1/Fas) ligand-expressing tumor cells--a mechanism of immune evasion?" Nat Med **2**(12): 1361-6.
 - Straus, D. S., Pascual, G., Li, M., Welch, J. S., Ricote, M., Hsiang, C. H., Sengchanthalangsy, L. L., Ghosh, G. and Glass, C. K. (2000). "15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J2 inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(9): 4844-9.
 - Strauss, L., Bergmann, C., Szczepanski, M., Gooding, W., Johnson, J. T. and Whiteside, T. L. (2007). "A unique subset of CD4+CD25highFoxp3+ T cells secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment." Clin Cancer Res **13**(15 Pt 1): 4345-54.
 - Street, S. E., Cretney, E. and Smyth, M. J. (2001). "Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis." Blood **97**(1): 192-7.
 - Strengell, M., Sareneva, T., Foster, D., Julkunen, I. and Matikainen, S. (2002). "IL-21 up-regulates the expression of genes associated with innate immunity and Th1 response." J Immunol **169**(7): 3600-5.
 - Strengell, M., Matikainen, S., Siren, J., Lehtonen, A., Foster, D., Julkunen, I. and Sareneva, T. (2003). "IL-21 in synergy with IL-15 or IL-18 enhances IFN-gamma production in human NK and T cells." J Immunol **170**(11): 5464-9.
 - Strowig, T., Brilot, F. and Munz, C. (2008). "Noncytotoxic functions of NK cells: direct pathogen restriction and assistance to adaptive immunity." J Immunol **180**(12): 7785-91.
 - Stulnig, T. M., Berger, M., Roden, M., Stingl, H., Raederstorff, D. and Waldhausl, W. (2000). "Elevated serum free fatty acid concentrations inhibit T lymphocyte signaling." FASEB J **14**(7): 939-47.
 - Stutman, O. (1975). "Immunodepression and malignancy." Adv Cancer Res **22**: 261-422.
 - Subbaramaiah, K. and Dannenberg, A. J. (2003). "Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment." Trends Pharmacol Sci **24**(2): 96-102.
 - Suchanek, K. M., May, F. J., Robinson, J. A., Lee, W. J., Holman, N. A., Monteith, G. R. and Roberts-Thomson, S. J. (2002). "Peroxisome proliferator-activated receptor alpha in the human breast cancer cell lines MCF-7 and MDA-MB-231." Mol Carcinog **34**(4): 165-71.
 - Suchner, U., Kuhn, K. S. and Furst, P. (2000). "The scientific basis of immunonutrition." Proc Nutr Soc **59**(4): 553-63.
 - Suzuki, N., Suzuki, T. and Engleman, E. G. (1991). "Evidence for the involvement of CD56 molecules in alloantigen-specific recognition by human natural killer cells." J Exp Med **173**(6): 1451-61.
 - Svensson, C. I. and Yaksh, T. L. (2002). "The spinal phospholipase-cyclooxygenase-prostanoid cascade in nociceptive processing." Annu Rev Pharmacol Toxicol **42**: 553-83.
- T-
- Tai, P., Wang, J., Jin, H., Song, X., Yan, J., Kang, Y., Zhao, L., An, X., Du, X., Chen, X., Wang, S., Xia, G. and Wang, B. (2008). "Induction of regulatory T cells by physiological level estrogen." J Cell Physiol **214**(2): 456-64.
 - Takahashi, H., Feuerhake, F., Kutok, J. L., Monti, S., Dal Cin, P., Neuberg, D., Aster, J. C. and Shipp, M. A. (2006). "FAS death domain deletions and cellular FADD-like interleukin 1beta converting enzyme inhibitory protein (long) overexpression: alternative mechanisms for deregulating the extrinsic apoptotic pathway in diffuse large B-cell lymphoma subtypes." Clin Cancer Res **12**(11 Pt 1): 3265-71.
 - Takahashi, K. and Suzuki, K. (1993). "Association of insulin-like growth-factor-I-induced DNA synthesis with phosphorylation and nuclear exclusion of p53 in human breast cancer MCF-7 cells." Int J Cancer **55**(3): 453-8.

- Takahashi, M., Mutoh, M., Shoji, Y., Sato, H., Kamanaka, Y., Naka, M., Maruyama, T., Sugimura, T. and Wakabayashi, K. (2006). "Suppressive effect of an inducible nitric oxide inhibitor, ONO-1714, on AOM-induced rat colon carcinogenesis." *Nitric Oxide* **14**(2): 130-6.
- Takahashi, T. and Sakaguchi, S. (2003). "Naturally arising CD25+CD4+ regulatory T cells in maintaining immunologic self-tolerance and preventing autoimmune disease." *Curr Mol Med* **3**(8): 693-706.
- Takaki, R., Hayakawa, Y., Nelson, A., Sivakumar, P. V., Hughes, S., Smyth, M. J. and Lanier, L. L. (2005). "IL-21 enhances tumor rejection through a NKG2D-dependent mechanism." *J Immunol* **175**(4): 2167-73.
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Atsuta, M., Hong, S., Van Kaer, L., Kobayashi, K., Ito, M., Yagita, H. and Okumura, K. (2000). "Relative contribution of NK and NKT cells to the anti-metastatic activities of IL-12." *Int Immunol* **12**(6): 909-14.
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M. J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., Iwakura, Y., Yagita, H. and Okumura, K. (2001). "Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells." *Nat Med* **7**(1): 94-100.
- Takeda, K., Smyth, M. J., Cretney, E., Hayakawa, Y., Kayagaki, N., Yagita, H. and Okumura, K. (2002). "Critical role for tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in immune surveillance against tumor development." *J Exp Med* **195**(2): 161-9.
- Talbot, K. L., Turley, H., Gatter, K. C., Maxwell, P. H., Pugh, C. W., Ratcliffe, P. J. and Harris, A. L. (2000). "The expression and distribution of the hypoxia-inducible factors HIF-1alpha and HIF-2alpha in normal human tissues, cancers, and tumor-associated macrophages." *Am J Pathol* **157**(2): 411-21.
- Tappia, P. S. and Grimble, R. F. (1994). "Complex modulation of cytokine induction by endotoxin and tumour necrosis factor from peritoneal macrophages of rats by diets containing fats of different saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acid composition." *Clin Sci (Lond)* **87**(2): 173-8.
- Tartaglia, L. A., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G. J., Campfield, L. A., Clark, F. T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K. J., Smutko, J. S., Mays, G. G., Wool, E. A., Monroe, C. A. and Tepper, R. I. (1995). "Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R." *Cell* **83**(7): 1263-71.
- Tato, C. M. and O'Shea, J. J. (2006). "Immunology: what does it mean to be just 17?" *Nature* **441**(7090): 166-8.
- Taub, D. D., Sayers, T. J., Carter, C. R. and Ortaldo, J. R. (1995). "Alpha and beta chemokines induce NK cell migration and enhance NK-mediated cytotoxicity." *J Immunol* **155**(8): 3877-88.
- Taub, D. D., Ortaldo, J. R., Turcovski-Corrales, S. M., Key, M. L., Longo, D. L. and Murphy, W. J. (1996). "Beta chemokines costimulate lymphocyte cytotoxicity, proliferation, and lymphokine production." *J Leukoc Biol* **59**(1): 81-9.
- Taylor, M. W. and Feng, G. S. (1991). "Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism." *FASEB J* **5**(11): 2516-22.
- Terabe, M., Matsui, S., Park, J. M., Mamura, M., Noben-Trauth, N., Donaldson, D. D., Chen, W., Wahl, S. M., Ledbetter, S., Pratt, B., Letterio, J. J., Paul, W. E. and Berzofsky, J. A. (2003). "Transforming growth factor-beta production and myeloid cells are an effector mechanism through which CD1d-restricted T cells block cytotoxic T lymphocyte-mediated tumor immunosurveillance: abrogation prevents tumor recurrence." *J Exp Med* **198**(11): 1741-52.
- Terabe, M. and Berzofsky, J. A. (2008). "The role of NKT cells in tumor immunity." *Adv Cancer Res* **101**: 277-348.
- Thiebaut, A. C. and Clavel-Chapelon, F. (2001). "[Fat consumption and breast cancer: preliminary results from the E3N-Epic cohort]." *Bull Cancer* **88**(10): 954-8.
- Thiebaut, A. C., Chajes, V., Gerber, M., Boutron-Ruault, M. C., Joulin, V., Lenoir, G., Berrino, F., Riboli, E., Benichou, J. and Clavel-Chapelon, F. (2009). "Dietary intakes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids and the risk of breast cancer." *Int J Cancer* **124**(4): 924-31.
- Thieringer, R., Fenik-Melody, J. E., Le Grand, C. B., Shelton, B. A., Detmers, P. A., Somers, E. P., Carbin, L., Moller, D. E., Wright, S. D. and Berger, J. (2000). "Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma does not inhibit IL-6 or TNF-alpha responses of macrophages to lipopolysaccharide in vitro or in vivo." *J Immunol* **164**(2): 1046-54.
- Thies, F., Nebe-von-Caron, G., Powell, J. R., Yaquob, P., Newsholme, E. A. and Calder, P. C. (2001). "Dietary supplementation with eicosapentaenoic acid, but not with other long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids, decreases natural killer cell activity in healthy subjects aged >55 y." *Am J Clin Nutr* **73**(3): 539-48.
- Thill, M., Fischer, D., Becker, S., Cordes, T., Dittmer, C., Diedrich, K., Salehin, D. and Friedrich, M. (2009). "Prostaglandin metabolizing enzymes in correlation with vitamin D receptor in benign and malignant breast cell lines." *Anticancer Res* **29**(9): 3619-25.
- Thomas, D. A., Du, C., Xu, M., Wang, X. and Ley, T. J. (2000). "DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis." *Immunity* **12**(6): 621-32.

- Thomas, D. A. and Massague, J. (2005). "TGF-beta directly targets cytotoxic T cell functions during tumor evasion of immune surveillance." *Cancer Cell* **8**(5): 369-80.
- Thomassen, E., Bird, T. A., Renshaw, B. R., Kennedy, M. K. and Sims, J. E. (1998). "Binding of interleukin-18 to the interleukin-1 receptor homologous receptor IL-1Rrp1 leads to activation of signaling pathways similar to those used by interleukin-1." *J Interferon Cytokine Res* **18**(12): 1077-88.
- Thompson, J. A., Curti, B. D., Redman, B. G., Bhatia, S., Weber, J. S., Agarwala, S. S., Sievers, E. L., Hughes, S. D., DeVries, T. A. and Hausman, D. F. (2008). "Phase I study of recombinant interleukin-21 in patients with metastatic melanoma and renal cell carcinoma." *J Clin Oncol* **26**(12): 2034-9.
- Thomsen, L. L., Lawton, F. G., Knowles, R. G., Beesley, J. E., Riveros-Moreno, V. and Moncada, S. (1994). "Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer." *Cancer Res* **54**(5): 1352-4.
- Thomsen, L. L., Miles, D. W., Happerfield, L., Bobrow, L. G., Knowles, R. G. and Moncada, S. (1995). "Nitric oxide synthase activity in human breast cancer." *Br J Cancer* **72**(1): 41-4.
- Thomsen, L. L. and Miles, D. W. (1998). "Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours." *Cancer Metastasis Rev* **17**(1): 107-18.
- Tian, Z., Sun, R., Wei, H. and Gao, B. (2002). "Impaired natural killer (NK) cell activity in leptin receptor deficient mice: leptin as a critical regulator in NK cell development and activation." *Biochem Biophys Res Commun* **298**(3): 297-302.
- Tieng, V., Le Bouguenec, C., du Merle, L., Bertheau, P., Desreumaux, P., Janin, A., Charron, D. and Toubert, A. (2002). "Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 2977-82.
- Tillman, D. M., Petak, I. and Houghton, J. A. (1999). "A Fas-dependent component in 5-fluorouracil/leucovorin-induced cytotoxicity in colon carcinoma cells." *Clin Cancer Res* **5**(2): 425-30.
- Timmer, T., de Vries, E. G. and de Jong, S. (2002). "Fas receptor-mediated apoptosis: a clinical application?" *J Pathol* **196**(2): 125-34.
- Ting, A. T., Dick, C. J., Schoon, R. A., Karnitz, L. M., Abraham, R. T. and Leibson, P. J. (1995). "Interaction between lck and syk family tyrosine kinases in Fc gamma receptor-initiated activation of natural killer cells." *J Biol Chem* **270**(27): 16415-21.
- Todaro, M., D'Asaro, M., Caccamo, N., Iovino, F., Francipane, M. G., Meraviglia, S., Orlando, V., La Mendola, C., Gulotta, G., Salerno, A., Dieli, F. and Stassi, G. (2009). "Efficient killing of human colon cancer stem cells by gammadelta T lymphocytes." *J Immunol* **182**(11): 7287-96.
- Toi, M., Taniguchi, T., Yamamoto, Y., Kurisaki, T., Suzuki, H. and Tominaga, T. (1996). "Clinical significance of the determination of angiogenic factors." *Eur J Cancer* **32A**(14): 2513-9.
- Torigoe, K., Ushio, S., Okura, T., Kobayashi, S., Taniai, M., Kunikata, T., Murakami, T., Sanou, O., Kojima, H., Fujii, M., Ohta, T., Ikeda, M., Ikegami, H. and Kurimoto, M. (1997). "Purification and characterization of the human interleukin-18 receptor." *J Biol Chem* **272**(41): 25737-42.
- Townson, D. H. and Liptak, A. R. (2003). "Chemokines in the corpus luteum: implications of leukocyte chemotaxis." *Reprod Biol Endocrinol* **1**: 94.
- Trapani, J. A., Sutton, V. R., Thia, K. Y., Li, Y. Q., Froelich, C. J., Jans, D. A., Sandrin, M. S. and Browne, K. A. (2003). "A clathrin/dynamin- and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death." *J Cell Biol* **160**(2): 223-33.
- Treeck, O., Lattrich, C., Springwald, A. and Ortmann, O. (2010). "Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells." *Breast Cancer Res Treat* **120**(3): 557-65.
- Triebel, F. and Hercend, T. (1989). "Subpopulations of human peripheral T gamma delta lymphocytes." *Immunol Today* **10**(6): 186-8.
- Trinchieri, G. (1989). "Biology of natural killer cells." *Adv Immunol* **47**: 187-376.
- Trinchieri, G. (2003). "Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity." *Nat Rev Immunol* **3**(2): 133-46.
- Trombetta, E. S. and Mellman, I. (2005). "Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo." *Annu Rev Immunol* **23**: 975-1028.
- Trowsdale, J. (2001). "Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes." *Immunity* **15**(3): 363-74.
- Trzonkowski, P., Szmit, E., Mysliwska, J., Dobyszyk, A. and Mysliwski, A. (2004). "CD4+CD25+ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8+ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction." *Clin Immunol* **112**(3): 258-67.
- Tschop, J., Nogueiras, R., Haas-Lockie, S., Kasten, K. R., Castaneda, T. R., Huber, N., Guanciale, K., Perez-Tilve, D., Habegger, K., Ottaway, N., Woods, S. C., Oldfield, B., Clarke, I., Chua, S., Jr., Farooqi, I. S., O'Rahilly, S., Caldwell, C. C. and Tschop, M. H. (2010). "CNS leptin action modulates immune response and survival in sepsis." *J Neurosci* **30**(17): 6036-47.

- Tsdo, M., Goldman, C. K., Bongiovanni, K. F., Chan, W. C., Winton, E. F., Yagita, M., Grimm, E. A. and Waldmann, T. A. (1987). "The p75 peptide is the receptor for interleukin 2 expressed on large granular lymphocytes and is responsible for the interleukin 2 activation of these cells." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(15): 5394-8.
 - Tsuji, M., Kawano, S. and DuBois, R. N. (1997). "Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(7): 3336-40.
 - Tsuji, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M. and DuBois, R. N. (1998). "Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells." Cell **93**(5): 705-16.
 - Tu, H., Kastin, A. J., Hsueh, H. and Pan, W. (2008). "Soluble receptor inhibits leptin transport." J Cell Physiol **214**(2): 301-5.
- U-
- Uefuji, K., Ichikura, T. and Mochizuki, H. (2000). "Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer." Clin Cancer Res **6**(1): 135-8.
 - Ugai, S., Shimozato, O., Yu, L., Wang, Y. Q., Kawamura, K., Yamamoto, H., Yamaguchi, T., Saisho, H., Sakiyama, S. and Tagawa, M. (2003). "Transduction of the IL-21 and IL-23 genes in human pancreatic carcinoma cells produces natural killer cell-dependent and -independent antitumor effects." Cancer Gene Ther **10**(10): 771-8.
 - Uhrberg, M., Valiante, N. M., Shum, B. P., Shilling, H. G., Lienert-Weidenbach, K., Corliss, B., Tyman, D., Lanier, L. L. and Parham, P. (1997). "Human diversity in killer cell inhibitory receptor genes." Immunity **7**(6): 753-63.
 - Ullberg, M. and Jondal, M. (1981). "Recycling and target binding capacity of human natural killer cells." J Exp Med **153**(3): 615-28.
 - Urosevic, M., Kurrer, M. O., Kamarashev, J., Mueller, B., Weder, W., Burg, G., Stahel, R. A., Dummer, R. and Trojan, A. (2001). "Human leukocyte antigen G up-regulation in lung cancer associates with high-grade histology, human leukocyte antigen class I loss and interleukin-10 production." Am J Pathol **159**(3): 817-24.
 - Urosevic, M. and Dummer, R. (2003). "HLA-G and IL-10 expression in human cancer--different stories with the same message." Semin Cancer Biol **13**(5): 337-42.
 - Uytendhoeve, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T. and Van den Eynde, B. J. (2003). "Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase." Nat Med **9**(10): 1269-74.
- V-
- Vakkala, M., Paakko, P. and Soini, Y. (2000). "eNOS expression is associated with the estrogen and progesterone receptor status in invasive breast carcinoma." Int J Oncol **17**(4): 667-71.
 - Vales-Gomez, M., Reyburn, H. T., Erskine, R. A. and Strominger, J. (1998). "Differential binding to HLA-C of p50-activating and p58-inhibitory natural killer cell receptors." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14326-31.
 - van den Bosch, G., Preijers, F., Vreugdenhil, A., Hendriks, J., Maas, F. and De Witte, T. (1995). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) counteracts the inhibiting effect of monocytes on natural killer (NK) cells." Clin Exp Immunol **101**(3): 515-20.
 - Van Der Bruggen, P., Zhang, Y., Chaux, P., Stroobant, V., Panichelli, C., Schultz, E. S., Chapiro, J., Van Den Eynde, B. J., Bressan, F. and Boon, T. (2002). "Tumor-specific shared antigenic peptides recognized by human T cells." Immunol Rev **188**: 51-64.
 - van der Burg, B., Kalkhoven, E., Isbrucker, L. and de Laat, S. W. (1992). "Effects of progestins on the proliferation of estrogen-dependent human breast cancer cells under growth factor-defined conditions." J Steroid Biochem Mol Biol **42**(5): 457-65.
 - van Landeghem, A. A., Poortman, J., Nabuurs, M. and Thijssen, J. H. (1985). "Endogenous concentration and subcellular distribution of estrogens in normal and malignant human breast tissue." Cancer Res **45**(6): 2900-6.
 - VandenBussche, C. J., Mulrooney, T. J., Frazier, W. R., Dakshanamurthy, S. and Hurley, C. K. (2009). "Dramatically reduced surface expression of NK cell receptor KIR2DS3 is attributed to multiple residues throughout the molecule." Genes Immun **10**(2): 162-73.
 - Vesely, M. D., Kershaw, M. H., Schreiber, R. D. and Smyth, M. J. (2011). "Natural innate and adaptive immunity to cancer." Annu Rev Immunol **29**: 235-71.
 - Vilches, C. and Parham, P. (2002). "KIR: diverse, rapidly evolving receptors of innate and adaptive immunity." Annu Rev Immunol **20**: 217-51.
 - Villadangos, J. A. and Young, L. (2008). "Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells." Immunity **29**(3): 352-61.

- Viola, A. and Bronte, V. (2007). "Metabolic mechanisms of cancer-induced inhibition of immune responses." *Semin Cancer Biol* **17**(4): 309-16.
- Visconti, R., Gadina, M., Chiariello, M., Chen, E. H., Stancato, L. F., Gutkind, J. S. and O'Shea, J. J. (2000). "Importance of the MKK6/p38 pathway for interleukin-12-induced STAT4 serine phosphorylation and transcriptional activity." *Blood* **96**(5): 1844-52.
- Vissers, Y. L., Dejong, C. H., Luiking, Y. C., Fearon, K. C., von Meyenfeldt, M. F. and Deutz, N. E. (2005). "Plasma arginine concentrations are reduced in cancer patients: evidence for arginine deficiency?" *Am J Clin Nutr* **81**(5): 1142-6.
- Vitale, C., Chiossone, L., Morreale, G., Lanino, E., Cottalasso, F., Moretti, S., Dini, G., Moretta, L. and Mingari, M. C. (2004). "Analysis of the activating receptors and cytolytic function of human natural killer cells undergoing in vivo differentiation after allogeneic bone marrow transplantation." *Eur J Immunol* **34**(2): 455-60.
- Vitale, M., Bottino, C., Sivori, S., Sanseverino, L., Castriconi, R., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Moretta, L. and Moretta, A. (1998). "NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis." *J Exp Med* **187**(12): 2065-72.
- Vitale, M., Della Chiesa, M., Carlomagno, S., Pende, D., Arico, M., Moretta, L. and Moretta, A. (2005). "NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor." *Blood* **106**(2): 566-71.
- Vivier, E. (2006). "What is natural in natural killer cells?" *Immunol Lett* **107**(1): 1-7.
- Vivier, E., Raulet, D. H., Moretta, A., Caligiuri, M. A., Zitvogel, L., Lanier, L. L., Yokoyama, W. M. and Ugolini, S. (2011). "Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells." *Science* **331**(6013): 44-9.
- von Bergwelt-Baildon, M. S., Popov, A., Saric, T., Chemnitz, J., Classen, S., Stoffel, M. S., Fiore, F., Roth, U., Beyer, M., Debey, S., Wickenhauser, C., Hanisch, F. G. and Schultze, J. L. (2006). "CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition." *Blood* **108**(1): 228-37.
- Vona-Davis, L. and Rose, D. P. (2007). "Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression." *Endocr Relat Cancer* **14**(2): 189-206.
- Voskoboinik, I., Thia, M. C., Fletcher, J., Ciccone, A., Browne, K., Smyth, M. J. and Trapani, J. A. (2005). "Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491." *J Biol Chem* **280**(9): 8426-34.
- Voskoboinik, I. and Trapani, J. A. (2006). "Addressing the mysteries of perforin function." *Immunol Cell Biol* **84**(1): 66-71.
- Vyas, J. M., Van der Veen, A. G. and Ploegh, H. L. (2008). "The known unknowns of antigen processing and presentation." *Nat Rev Immunol* **8**(8): 607-18.
- Vyas, Y. M., Mehta, K. M., Morgan, M., Maniar, H., Butros, L., Jung, S., Burkhardt, J. K. and Dupont, B. (2001). "Spatial organization of signal transduction molecules in the NK cell immune synapses during MHC class I-regulated noncytolytic and cytolytic interactions." *J Immunol* **167**(8): 4358-67.
- W-
- Wakai, K., Hirose, K., Matsuo, K., Ito, H., Kuriki, K., Suzuki, T., Kato, T., Hirai, T., Kanemitsu, Y. and Tajima, K. (2006). "Dietary risk factors for colon and rectal cancers: a comparative case-control study." *J Epidemiol* **16**(3): 125-35.
- Walch, M., Latinovic-Golic, S., Velic, A., Sundstrom, H., Dumrese, C., Wagner, C. A., Groscurth, P. and Ziegler, U. (2007). "Perforin enhances the granulysin-induced lysis of *Listeria innocua* in human dendritic cells." *BMC Immunol* **8**: 14.
- Walczak, H. and Haas, T. L. (2008). "Biochemical analysis of the native TRAIL death-inducing signaling complex." *Methods Mol Biol* **414**: 221-39.
- Walker, M. R., Kasprlowicz, D. J., Gersuk, V. H., Benard, A., Van Landeghen, M., Buckner, J. H. and Ziegler, S. F. (2003). "Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells." *J Clin Invest* **112**(9): 1437-43.
- Wallace, F. A., Miles, E. A., Evans, C., Stock, T. E., Yaqoob, P. and Calder, P. C. (2001). "Dietary fatty acids influence the production of Th1- but not Th2-type cytokines." *J Leukoc Biol* **69**(3): 449-57.
- Walsh, P. T. and O'Connor, R. (2000). "The insulin-like growth factor-I receptor is regulated by CD28 and protects activated T cells from apoptosis." *Eur J Immunol* **30**(4): 1010-8.
- Walzer, T., Dalod, M., Robbins, S. H., Zitvogel, L. and Vivier, E. (2005). "Natural-killer cells and dendritic cells: "l'union fait la force". " *Blood* **106**(7): 2252-8.

- Wang, J., Simonavicius, N., Wu, X., Swaminath, G., Reagan, J., Tian, H. and Ling, L. (2006). "Kynurenic acid as a ligand for orphan G protein-coupled receptor GPR35." *J Biol Chem* **281**(31): 22021-8.
- Wang, W., Gulden, P. H., Pierce, R. A., Shabanowitz, J., Man, S. T., Hunt, D. F. and Engelhard, V. H. (1997). "A naturally processed peptide presented by HLA-A*0201 is expressed at low abundance and recognized by an alloreactive CD8+ cytotoxic T cell with apparent high affinity." *J Immunol* **158**(12): 5797-804.
- Warburg, O. (1956). "On the origin of cancer cells." *Science* **123**(3191): 309-14.
- Warren, H. S., Kinnear, B. F., Kastelein, R. L. and Lanier, L. L. (1996). "Analysis of the costimulatory role of IL-2 and IL-15 in initiating proliferation of resting (CD56dim) human NK cells." *J Immunol* **156**(9): 3254-9.
- Warren, H. S., Jones, A. L., Freeman, C., Bettadapura, J. and Parish, C. R. (2005). "Evidence that the cellular ligand for the human NK cell activation receptor NKp30 is not a heparan sulfate glycosaminoglycan." *J Immunol* **175**(1): 207-12.
- Waterhouse, N. J., Sedelies, K. A. and Trapani, J. A. (2006). "Role of Bid-induced mitochondrial outer membrane permeabilization in granzyme B-induced apoptosis." *Immunol Cell Biol* **84**(1): 72-8.
- Watson, N. F., Ramage, J. M., Madjd, Z., Spendlove, I., Ellis, I. O., Scholefield, J. H. and Durrant, L. G. (2006). "Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis." *Int J Cancer* **118**(1): 6-10.
- Watts, T. H. (2005). "TNF/TNFR family members in costimulation of T cell responses." *Annu Rev Immunol* **23**: 23-68.
- Watzl, C. and Long, E. O. (2010). "Signal transduction during activation and inhibition of natural killer cells." *Curr Protoc Immunol* **Chapter 11**: Unit 11 9B.
- Weatherill, A. R., Lee, J. Y., Zhao, L., Lemay, D. G., Youn, H. S. and Hwang, D. H. (2005). "Saturated and polyunsaturated fatty acids reciprocally modulate dendritic cell functions mediated through TLR4." *J Immunol* **174**(9): 5390-7.
- Wehling, M. (1997). "Specific, nongenomic actions of steroid hormones." *Annu Rev Physiol* **59**: 365-93.
- Wei, D., Richardson, E. L., Zhu, K., Wang, L., Le, X., He, Y., Huang, S. and Xie, K. (2003). "Direct demonstration of negative regulation of tumor growth and metastasis by host-inducible nitric oxide synthase." *Cancer Res* **63**(14): 3855-9.
- Wek, R. C., Jiang, H. Y. and Anthony, T. G. (2006). "Coping with stress: eIF2 kinases and translational control." *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 1): 7-11.
- Wen, Z. H., Su, Y. C., Lai, P. L., Zhang, Y., Xu, Y. F., Zhao, A., Yao, G. Y., Jia, C. H., Lin, J., Xu, S., Wang, L., Wang, X. K., Liu, A. L., Jiang, Y., Dai, Y. F. and Bai, X. C. (2012). "Critical role of arachidonic acid-activated mTOR signaling in breast carcinogenesis and angiogenesis." *Oncogene*.
- Wende, H., Colonna, M., Ziegler, A. and Volz, A. (1999). "Organization of the leukocyte receptor cluster (LRC) on human chromosome 19q13.4." *Mamm Genome* **10**(2): 154-60.
- Whang, D. H., Park, H., Yoon, J. A. and Park, M. H. (2005). "Haplotype analysis of killer cell immunoglobulin-like receptor genes in 77 Korean families." *Hum Immunol* **66**(2): 146-54.
- Wiemann, K., Mittrucker, H. W., Feger, U., Welte, S. A., Yokoyama, W. M., Spies, T., Rammensee, H. G. and Steinle, A. (2005). "Systemic NKG2D down-regulation impairs NK and CD8 T cell responses in vivo." *J Immunol* **175**(2): 720-9.
- Willett, W. C. (1995). "Diet, nutrition, and avoidable cancer." *Environ Health Perspect* **103 Suppl 8**: 165-70.
- Williams, C. S., Mann, M. and DuBois, R. N. (1999). "The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development." *Oncogene* **18**(55): 7908-16.
- Williams, C. S., Tsujii, M., Reese, J., Dey, S. K. and DuBois, R. N. (2000). "Host cyclooxygenase-2 modulates carcinoma growth." *J Clin Invest* **105**(11): 1589-94.
- Wilson, E. B., El-Jawhari, J. J., Neilson, A. L., Hall, G. D., Melcher, A. A., Meade, J. L. and Cook, G. P. (2011). "Human tumour immune evasion via TGF-beta blocks NK cell activation but not survival allowing therapeutic restoration of anti-tumour activity." *PLoS One* **6**(9): e22842.
- Wilson, J. L., Heffler, L. C., Charo, J., Scheynius, A., Bejarano, M. T. and Ljunggren, H. G. (1999). "Targeting of human dendritic cells by autologous NK cells." *J Immunol* **163**(12): 6365-70.
- Wink, D. A., Vodovotz, Y., Laval, J., Laval, F., Dewhirst, M. W. and Mitchell, J. B. (1998). "The multifaceted roles of nitric oxide in cancer." *Carcinogenesis* **19**(5): 711-21.
- Winter, C. C., Gumperz, J. E., Parham, P., Long, E. O. and Wagtmann, N. (1998). "Direct binding and functional transfer of NK cell inhibitory receptors reveal novel patterns of HLA-C allotype recognition." *J Immunol* **161**(2): 571-7.
- Wong, J. L., Mailliard, R. B., Moschos, S. J., Edington, H., Lotze, M. T., Kirkwood, J. M. and Kalinski, P. (2011). "Helper activity of natural killer cells during the dendritic cell-mediated induction of melanoma-specific cytotoxic T cells." *J Immunother* **34**(3): 270-8.

- Woods, S. C., Seeley, R. J., Porte, D., Jr. and Schwartz, M. W. (1998). "Signals that regulate food intake and energy homeostasis." *Science* **280**(5368): 1378-83.
 - Wrann, C. D., Laue, T., Hubner, L., Kuhlmann, S., Jacobs, R., Goudeva, L. and Nave, H. (2012). "Short-term and long-term leptin exposure differentially affect human natural killer cell immune functions." *Am J Physiol Endocrinol Metab* **302**(1): E108-16.
 - Wu, G. and Morris, S. M., Jr. (1998). "Arginine metabolism: nitric oxide and beyond." *Biochem J* **336** (Pt 1): 1-17.
 - Wu, J., Cherwinski, H., Spies, T., Phillips, J. H. and Lanier, L. L. (2000). "DAP10 and DAP12 form distinct, but functionally cooperative, receptor complexes in natural killer cells." *J Exp Med* **192**(7): 1059-68.
 - Wu, M. H., Chou, Y. C., Chou, W. Y., Hsu, G. C., Chu, C. H., Yu, C. P., Yu, J. C. and Sun, C. A. (2009). "Circulating levels of leptin, adiposity and breast cancer risk." *Br J Cancer* **100**(4): 578-82.
 - Wucherpfennig, K. W., Gagnon, E., Call, M. J., Huseby, E. S. and Call, M. E. (2010). "Structural biology of the T-cell receptor: insights into receptor assembly, ligand recognition, and initiation of signaling." *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**(4): a005140.
 - Wulfig, C. and Davis, M. M. (1998). "A receptor/cytoskeletal movement triggered by costimulation during T cell activation." *Science* **282**(5397): 2266-9.
- X-
- Xiao, L., Eneroth, P. H. and Qureshi, G. A. (1995). "Nitric oxide synthase pathway may mediate human natural killer cell cytotoxicity." *Scand J Immunol* **42**(5): 505-11.
 - Xie, K. and Fidler, I. J. (1998). "Therapy of cancer metastasis by activation of the inducible nitric oxide synthase." *Cancer Metastasis Rev* **17**(1): 55-75.
 - Xiong, N. and Raulet, D. H. (2007). "Development and selection of gammadelta T cells." *Immunol Rev* **215**: 15-31.
 - Xu, W., Liu, L., Charles, I. G. and Moncada, S. (2004). "Nitric oxide induces coupling of mitochondrial signalling with the endoplasmic reticulum stress response." *Nat Cell Biol* **6**(11): 1129-34.
- Y-
- Yamashita, N., Maruyama, M., Yamazaki, K., Hamazaki, T. and Yano, S. (1991). "Effect of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid on natural killer cell activity in human peripheral blood lymphocytes." *Clin Immunol Immunopathol* **59**(3): 335-45.
 - Yan, W. and Chen, X. (2006). "GPX2, a direct target of p63, inhibits oxidative stress-induced apoptosis in a p53-dependent manner." *J Biol Chem* **281**(12): 7856-62.
 - Yang, L., Huang, J., Ren, X., Gorska, A. E., Chytil, A., Aakre, M., Carbone, D. P., Matrisian, L. M., Richmond, A., Lin, P. C. and Moses, H. L. (2008). "Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis." *Cancer Cell* **13**(1): 23-35.
 - Yang, L. and Moses, H. L. (2008). "Transforming growth factor beta: tumor suppressor or promoter? Are host immune cells the answer?" *Cancer Res* **68**(22): 9107-11.
 - Yang, L., Pang, Y. and Moses, H. L. (2010). "TGF-beta and immune cells: an important regulatory axis in the tumor microenvironment and progression." *Trends Immunol* **31**(6): 220-7.
 - Yang, R., Cai, Z., Zhang, Y., Yutzy, W. H. t., Roby, K. F. and Roden, R. B. (2006). "CD80 in immune suppression by mouse ovarian carcinoma-associated Gr-1+CD11b+ myeloid cells." *Cancer Res* **66**(13): 6807-15.
 - Yang, Y., Chu, W., Geraghty, D. E. and Hunt, J. S. (1996). "Expression of HLA-G in human mononuclear phagocytes and selective induction by IFN-gamma." *J Immunol* **156**(11): 4224-31.
 - Yannelli, J. R., Sullivan, J. A., Mandell, G. L. and Engelhard, V. H. (1986). "Reorientation and fusion of cytotoxic T lymphocyte granules after interaction with target cells as determined by high resolution cinemicrography." *J Immunol* **136**(2): 377-82.
 - Yaqoob, P., Newsholme, E. A. and Calder, P. C. (1994). "Inhibition of natural killer cell activity by dietary lipids." *Immunol Lett* **41**(2-3): 241-7.
 - Yaqoob, P. and Calder, P. (1995). "Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages." *Cell Immunol* **163**(1): 120-8.
 - Yaqoob, P., Knapper, J. A., Webb, D. H., Williams, C. M., Newsholme, E. A. and Calder, P. C. (1998). "Effect of olive oil on immune function in middle-aged men." *Am J Clin Nutr* **67**(1): 129-35.
 - Yawata, M., Yawata, N., McQueen, K. L., Cheng, N. W., Guethlein, L. A., Rajalingam, R., Shilling, H. G. and Parham, P. (2002). "Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression." *Immunogenetics* **54**(8): 543-50.
 - Yawata, M., Yawata, N., Draghi, M., Little, A. M., Partheniou, F. and Parham, P. (2006). "Roles for HLA and KIR polymorphisms in natural killer cell repertoire selection and modulation of effector function." *J Exp Med* **203**(3): 633-45.

- Ye, Z. B., Ma, T., Li, H., Jin, X. L. and Xu, H. M. (2007). "Expression and significance of intratumoral interleukin-12 and interleukin-18 in human gastric carcinoma." *World J Gastroenterol* **13**(11): 1747-51.
 - Yin, N., Wang, D., Zhang, H., Yi, X., Sun, X., Shi, B., Wu, H., Wu, G., Wang, X. and Shang, Y. (2004). "Molecular mechanisms involved in the growth stimulation of breast cancer cells by leptin." *Cancer Res* **64**(16): 5870-5.
 - Yokoyama, W. M., Kim, S. and French, A. R. (2004). "The dynamic life of natural killer cells." *Annu Rev Immunol* **22**: 405-29.
 - Yokoyama, W. M. and Kim, S. (2006). "Licensing of natural killer cells by self-major histocompatibility complex class I." *Immunol Rev* **214**: 143-54.
 - Yonezawa, T., Katoh, K. and Obara, Y. (2004). "Existence of GPR40 functioning in a human breast cancer cell line, MCF-7." *Biochem Biophys Res Commun* **314**(3): 805-9.
 - Young, M. R., Wright, M. A., Lozano, Y., Prechel, M. M., Benefield, J., Leonetti, J. P., Collins, S. L. and Petruzzelli, G. J. (1997). "Increased recurrence and metastasis in patients whose primary head and neck squamous cell carcinomas secreted granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and contained CD34+ natural suppressor cells." *Int J Cancer* **74**(1): 69-74.
 - Yu, H., Fehniger, T. A., Fuchshuber, P., Thiel, K. S., Vivier, E., Carson, W. E. and Caligiuri, M. A. (1998). "Flt3 ligand promotes the generation of a distinct CD34(+) human natural killer cell progenitor that responds to interleukin-15." *Blood* **92**(10): 3647-57.
 - Yu, J., Heller, G., Chewning, J., Kim, S., Yokoyama, W. M. and Hsu, K. C. (2007). "Hierarchy of the human natural killer cell response is determined by class and quantity of inhibitory receptors for self-HLA-B and HLA-C ligands." *J Immunol* **179**(9): 5977-89.
 - Yu, J., Mao, H. C., Wei, M., Hughes, T., Zhang, J., Park, I. K., Liu, S., McClory, S., Marcucci, G., Trotta, R. and Caligiuri, M. A. (2010). "CD94 surface density identifies a functional intermediary between the CD56bright and CD56dim human NK-cell subsets." *Blood* **115**(2): 274-81.
 - Yu, M. C., Su, L. L., Zou, L., Liu, Y., Wu, N., Kong, L., Zhuang, Z. H., Sun, L., Liu, H. P., Hu, J. H., Li, D., Strominger, J. L., Zang, J. W., Pei, G. and Ge, B. X. (2008). "An essential function for beta-arrestin 2 in the inhibitory signaling of natural killer cells." *Nat Immunol* **9**(8): 898-907.
 - Yu, W., Israel, K., Liao, Q. Y., Aldaz, C. M., Sanders, B. G. and Kline, K. (1999). "Vitamin E succinate (VES) induces Fas sensitivity in human breast cancer cells: role for Mr 43,000 Fas in VES-triggered apoptosis." *Cancer Res* **59**(4): 953-61.
 - Yusa, S., Catina, T. L. and Campbell, K. S. (2002). "SHP-1- and phosphotyrosine-independent inhibitory signaling by a killer cell Ig-like receptor cytoplasmic domain in human NK cells." *J Immunol* **168**(10): 5047-57.
 - Yutkin, V., Pode, D., Pikarsky, E. and Mandelboim, O. (2007). "The expression level of ligands for natural killer cell receptors predicts response to bacillus Calmette-Guerin therapy: a pilot study." *J Urol* **178**(6): 2660-4.
- Z-
- Zafirova, B., Wensveen, F. M., Gulin, M. and Polic, B. (2011). "Regulation of immune cell function and differentiation by the NKG2D receptor." *Cell Mol Life Sci* **68**(21): 3519-29.
 - Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I. M., Azzoni, L., Alnemri, E. S. and Perussia, B. (1998). "Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells." *J Exp Med* **188**(12): 2375-80.
 - Zamarron, B. F. and Chen, W. (2011). "Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression." *Int J Biol Sci* **7**(5): 651-8.
 - Zarkesh-Esfahani, H., Pockley, G., Metcalfe, R. A., Bidlingmaier, M., Wu, Z., Ajami, A., Weetman, A. P., Strasburger, C. J. and Ross, R. J. (2001). "High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes." *J Immunol* **167**(8): 4593-9.
 - Zea, A. H., Rodriguez, P. C., Culotta, K. S., Hernandez, C. P., DeSalvo, J., Ochoa, J. B., Park, H. J., Zabaleta, J. and Ochoa, A. C. (2004). "L-Arginine modulates CD3zeta expression and T cell function in activated human T lymphocytes." *Cell Immunol* **232**(1-2): 21-31.
 - Zea, A. H., Rodriguez, P. C., Atkins, M. B., Hernandez, C., Signoretti, S., Zabaleta, J., McDermott, D., Quiceno, D., Youmans, A., O'Neill, A., Mier, J. and Ochoa, A. C. (2005). "Arginase-producing myeloid suppressor cells in renal cell carcinoma patients: a mechanism of tumor evasion." *Cancer Res* **65**(8): 3044-8.
 - Zeng, R., Spolski, R., Finkelstein, S. E., Oh, S., Kovanen, P. E., Hinrichs, C. S., Pise-Masison, C. A., Radonovich, M. F., Brady, J. N., Restifo, N. P., Berzofsky, J. A. and Leonard, W. J. (2005). "Synergy of IL-21 and IL-15 in regulating CD8+ T cell expansion and function." *J Exp Med* **201**(1): 139-48.
 - Zeng, R., Spolski, R., Casas, E., Zhu, W., Levy, D. E. and Leonard, W. J. (2007). "The molecular basis of IL-21-mediated proliferation." *Blood* **109**(10): 4135-42.

- Zeyda, M., Staffler, G., Horejsi, V., Waldhausl, W. and Stulnig, T. M. (2002). "LAT displacement from lipid rafts as a molecular mechanism for the inhibition of T cell signaling by polyunsaturated fatty acids." *J Biol Chem* **277**(32): 28418-23.
- Zhang, A. L., Colmenero, P., Purath, U., Teixeira de Matos, C., Hueber, W., Klareskog, L., Tarner, I. H., Engleman, E. G. and Soderstrom, K. (2007). "Natural killer cells trigger differentiation of monocytes into dendritic cells." *Blood* **110**(7): 2484-93.
- Zhang, B., Wu, K. F., Cao, Z. Y., Rao, Q., Ma, X. T., Zheng, G. G. and Li, G. (2004). "IL-18 increases invasiveness of HL-60 myeloid leukemia cells: up-regulation of matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) expression." *Leuk Res* **28**(1): 91-5.
- Zhang, C., Hein, T. W., Wang, W., Miller, M. W., Fossum, T. W., McDonald, M. M., Humphrey, J. D. and Kuo, L. (2004). "Upregulation of vascular arginase in hypertension decreases nitric oxide-mediated dilation of coronary arterioles." *Hypertension* **44**(6): 935-43.
- Zhang, C., Zhang, J., Sun, R., Feng, J., Wei, H. and Tian, Z. (2005). "Opposing effect of IFN γ and IFN α on expression of NKG2 receptors: negative regulation of IFN γ on NK cells." *Int Immunopharmacol* **5**(6): 1057-67.
- Zhang, C., Zhang, J., Niu, J., Zhou, Z. and Tian, Z. (2008). "Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D." *Hum Immunol* **69**(8): 490-500.
- Zhang, D., Pasternack, M. S., Beresford, P. J., Wagner, L., Greenberg, A. H. and Lieberman, J. (2001). "Induction of rapid histone degradation by the cytotoxic T lymphocyte protease Granzyme A." *J Biol Chem* **276**(5): 3683-90.
- Zhang, X. M. and Xu, Q. (2001). "Metastatic melanoma cells escape from immunosurveillance through the novel mechanism of releasing nitric oxide to induce dysfunction of immunocytes." *Melanoma Res* **11**(6): 559-67.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. and Friedman, J. M. (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." *Nature* **372**(6505): 425-32.
- Zhao, T., Zhang, H., Guo, Y. and Fan, Z. (2007). "Granzyme K directly processes bid to release cytochrome c and endonuclease G leading to mitochondria-dependent cell death." *J Biol Chem* **282**(16): 12104-11.
- Zhao, Y., Sun, R., You, L., Gao, C. and Tian, Z. (2003). "Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines." *Biochem Biophys Res Commun* **300**(2): 247-52.
- Zhou, J., Zhang, J., Lichtenheld, M. G. and Meadows, G. G. (2002). "A role for NF-kappa B activation in perforin expression of NK cells upon IL-2 receptor signaling." *J Immunol* **169**(3): 1319-25.
- Zingoni, A., Sornasse, T., Cocks, B. G., Tanaka, Y., Santoni, A. and Lanier, L. L. (2004). "Cross-talk between activated human NK cells and CD4 $^{+}$ T cells via OX40-OX40 ligand interactions." *J Immunol* **173**(6): 3716-24.
- Zompi, S. and Colucci, F. (2005). "Anatomy of a murder--signal transduction pathways leading to activation of natural killer cells." *Immunol Lett* **97**(1): 31-9.
- Zou, J., Presky, D. H., Wu, C. Y. and Gubler, U. (1997). "Differential associations between the cytoplasmic regions of the interleukin-12 receptor subunits beta1 and beta2 and JAK kinases." *J Biol Chem* **272**(9): 6073-7.
- Zou, W., Machelon, V., Coulomb-L'Hermin, A., Borvak, J., Nome, F., Isaeva, T., Wei, S., Krzysiek, R., Durand-Gasselin, I., Gordon, A., Pustilnik, T., Curiel, D. T., Galanaud, P., Capron, F., Emilie, D. and Curiel, T. J. (2001). "Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells." *Nat Med* **7**(12): 1339-46.

Partie VI Production scientifique

Production scientifique

Publications

B. Lamas, R. Nachat-Kappes, N. Goncalves-Mendes, F. Mishellany, A. Rossary, MP. Vasson, MC. Farges. "Dietary fat without body weight gain increases *in vivo* MCF-7 human breast cancer cells growth and decreases Natural Killer cytotoxicity" soumise à Molecular Carcinogenesis.

B. Lamas, N. Goncalves-Mendes, R. Nachat-Kappes, A. Rossary, F. Caldefie-Chezet, MP. Vasson, MC. Farges. "Leptin modulates dose-dependently the metabolic and cytolytic activities of *in vitro* NK-92 cells" soumise à Journal of Cellular Physiology.

B. Lamas, J. Vergnaud-Gauduchon, N. Goncalves-Mendes, O. Perche, A. Rossary, MP. Vasson, MC. Farges. "Altered functions of Natural Killer cells in response to L-arginine availability" soumise à Cellular Immunology.

Communications orales en congrès internationaux (COI) et nationaux (CON)

COI 1 B. Lamas, J. Vergnaud-Gauduchon, N. Goncalves-Mendes, S. Rougé, MP. Vasson et MC. Farges. "Does L-Arginine availability modulates NK cell functions ? *In vitro* approaches". Clinical Nutrition Week, Las Vegas 8-12 Février 2010.

COI 2 B. Lamas, J. Vergnaud-Gauduchon, S. Rougé, MP. Vasson, MC. Farges. "*In vitro* L-arginine deprivation impairs Natural Killer Cell functions". 32nd European Society of Parenteral and Enteral Nutrition Congress, Nice 5-8 Septembre 2010. Résumé publié dans Clinical Nutrition 2010;5(2):20.

COI 3 B. Lamas, MC. Farges, S. Rougé, N. Goncalves-Mendes, A. Rossary, J. Vergnaud-Gauduchon, et MP. Vasson. "NK cell functional adaptation to L-Arg availability: *in vitro* approaches". 7th Asia Pacific Conference on Clinical Nutrition. Bangkok, 5-9 Juin 2011.

CON 1 B. Lamas, S. Rougé, A. Rossary, G. Garrait, L. Delort, H. Billard, N. Goncalves-Mendes, F. Caldefie-Chézet, MP. Vasson et MC. Farges. "Un régime hypercalorique modifie l'activité des cellules NK et accélère le développement tumoral mammaire : approche expérimentale chez la souris « nude »". Journée Francophone de Nutrition, Reims, 7-9 Décembre 2011. Résumé publié dans Nutrition Clinique et Métabolisme 2011;25(2):S129-130.

Communications affichées en congrès internationaux (CAI) et nationaux (CAN)

CAI 1 B. Lamas, J. Vergnaud-Gauduchon, O. Perche, N. Goncalves-Mendes, S. Rougé, MP. Vasson et MC. Farges. "Arginine effects on NK-92 cell functions". 9th Euroconference on Clinical Cell Analysis, Saint-Etienne, 10-12 Septembre 2009. Résumé publié dans programme : 76.

CAI 2 B. Lamas, MC. Farges, J. Vergnaud-Gauduchon, S. Rougé, N. Goncalves-Mendes, A. Rossary et MP. Vasson. "Does leptin modulate the NK cell functions? An *in vitro* approach" (outstanding abstract). 33rd European Society of Parenteral and Enteral Nutrition Congress, Goteborg, 3-6 Septembre 2011. Résumé publié dans Clinical Nutrition 2011;6 suppl.1:133-134.

CAN 1 J. Vergnaud-Gauduchon, B. Lamas, O. Perche, H. Laroye, S. Rougé, MC. Farges et MP. Vasson. "Evaluation de la fonctionnalité des cellules NK sanguines en situation de cancer : influence de l'isolement des cellules par tri magnétique". XXVIII^{ème} Forum de Cancérologie, Paris, 24-26 Juin 2008. Résumé publié dans Bulletin du Cancer 2008;95:643-644.

CAN 2 B. Lamas, J. Vergnaud-Gauduchon, O. Perche, N. Goncalves-Mendes, S. Rougé, MP. Vasson et MC. Farges. "Effet *in vitro* de l'arginine sur la prolifération, la survie et la cytotoxicité de la lignée

cellulaire NK-92". 7^{ème} Journée Francophone de Nutrition, Brest, 26-28 Novembre 2008. Résumé publié dans Nutrition Clinique et Métabolisme 2008;22:S134.

CAN 3 B. Lamas, J. Vergnaud-Gauduchon, O. Perche, N. Goncalves-Mendes, S. Rougé, MC. Farges et MP. Vasson. "Effet d'une déplétion en arginine sur l'expression des gènes de son métabolisme et sur l'activité cellulaire : étude des cellules NK *in vitro*". 26^{ème} Journée de la Société Francophone Nutrition Clinique et Métabolisme, Clermont-Ferrand, 25-27 Novembre 2009. Résumé publié dans Nutrition Clinique et Métabolisme 2009;23:S35.

Communications orales ou affichées en séminaires scientifiques (COS ou CAS)

COS 1 B. Lamas, J. Vergnaud-Gauduchon, O. Perche, N. Goncalves-Mendes, S. Rougé, MP. Vasson et MC. Farges. "Effet *in vitro* de l'arginine sur la prolifération, la survie et la cytotoxicité de la lignée cellulaire NK-92". 1^{ère} Journée Scientifique du C RNH Auvergne, Clermont-Ferrand, 3 Décembre 2008. Résumé publié dans programme : 14.

COS 2 B. Lamas, J. Vergnaud-Gauduchon, O. Perche, N. Goncalves-Mendes, S. Rougé, MP. Vasson et MC. Farges. "Impact de l'arginine sur les propriétés prolifératives et fonctionnelles des NK humaines". 10^{ème} Journées Stéphanoises de cytométrie, Saint Etienne, 17 et 18 juin 2009.

COS 3 B. Lamas, J. Vergnaud-Gauduchon, O. Perche, S. Rougé, MC. Farges et MP. Vasson. "Activité cytolytique des cellules Natural Killer humaines en réponse à une déplétion en arginine". Journée de la Recherche Sciences de la Vie et de la Santé, Clermont-Ferrand, 29 Octobre 2009. Résumé publié dans programme : 15

COS 4 B. Lamas, J. Vergnaud-Gauduchon, N. Goncalves-Mendes, A. Rossary, MP. Vasson et MC. Farges. "La disponibilité en arginine module la fonctionnalité des cellules NK : approches *in vitro* à partir de la lignée NK-92 et de NK humaines isolées". 1^{ère} Journée des Doctorants de l'Unité de Nutrition Humaine, UMR 1019 INRA/Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, 24 Mai 2011.

CAS 1 J. Vergnaud-Gauduchon, B. Lamas, O. Perche, H. Laroye, G. Garrait, N. Goncalves-Mendes, MC. Farges et MP. Vasson. "Exploration des cellules Natural Killer en situation de cancer : phénotypage et activité cytotoxique. Introduction à l'étude de l'impact de l'arginine". 3^{ème} Journée Cancéropôle CLARA, Lyon, 18 et 19 Mars 2008.

CAS 2 B. Lamas, J. Vergnaud-Gauduchon, O. Perche, N. Goncalves-Mendes, S. Rougé, MP. Vasson et MC. Farges. "Comparaison de l'expression génique des transporteurs et des enzymes du métabolisme de l'arginine des cellules Natural Killer humaines *versus* NK-92". Journée de la Recherche Sciences de la Vie et de la Santé, Clermont-Ferrand 27 Novembre 2008. Résumé publié dans programme : 52

CAS 3 B. Lamas, J. Vergnaud-Gauduchon, O. Perche, N. Goncalves-Mendes, S. Rougé, MP. Vasson et MC. Farges. "L'arginine module *in vitro* l'expression génique et la fonctionnalité des cellules NK-92". 4^{ème} Journée Scientifique du C LARA, Archamps, 24 et 25 mars 2009. Résumé publié dans Bulletin du Cancer 2009 ; 96 : S96.

CAS 4 B. Lamas, J. Vergnaud-Gauduchon, O. Perche, N. Goncalves-Mendes, S. Rougé, MP. Vasson et MC. Farges. "L'arginine : modulateur *in vitro* de l'expression génique et la fonctionnalité des cellules NK-92 ?". Journée de l'Ecole Doctorale, Clermont-Ferrand, 14 et 15 mai 2009.

CAS 5 B. Lamas, J. Vergnaud-Gauduchon, O. Perche, N. Goncalves-Mendes, S. Rougé, MP. Vasson et MC. Farges. "Adaptations génique et fonctionnelle des cellules NK à la disponibilité en arginine". 2^{ème} Journée Scientifique du CRNH Auvergne, Clermont-Ferrand, 3 Décembre 2009. Résumé publié dans programme : 26

CAS 6 B. Lamas, J. Vergnaud-Gauduchon, MP. Vasson et MC. Farges. "La disponibilité en arginine contrôle l'action anti-tumorale des cellules Natural Killer : implication des récepteurs activateurs

NKp30 et NKp46 ?”. 5^{ème} Journée Scientifique du CLARA, Lyon, 30 et 31 mars 2010. Résumé publié dans Bulletin du Cancer 2010;97:S42

CAS 7 B. Lamas, S. Rougé, A. Rossary, G. Garrait, L. Delort, H. Billard, N. Goncalves-Mendes, F. Caldefie-Chézet, MP. Vasson et MC. Farges. “Impact d’un régime hyper-calorique sur le développement tumoral mammaire : approche expérimentale chez la souris « nude »”. 6^{ème} Journée Scientifique du CLARA, Lyon, 28 et 29 mars 2011. Résumé publié dans Bulletin du Cancer 2011;98:S98.

CAS 8 B. Lamas, J. Vergnaud-Gauduchon, N. Goncalves-Mendes, A. Rossary, MP. Vasson et MC. Farges. “Adaptations fonctionnelle et métabolique des cellules NK à la disponibilité en arginine : approches *in vitro*”. 6^{ème} Journée Scientifique du CLARA, Lyon, 28 et 29 mars 2011. Résumé publié dans Bulletin du Cancer 2011;98:S97.

CAS 9 B. Lamas, J. Vergnaud-Gauduchon, N. Goncalves-Mendes, A. Rossary, MP. Vasson et MC. Farges. “La disponibilité en arginine module la fonctionnalité des cellules NK : approches *in vitro* à partir de la lignée NK-92 et de NK humaines isolées”. Séminaire CLARA-NACRe Nutrition et Cancer : prévention primaire, secondaire et tertiaire, Lyon, 19 Mai 2011.

CAS 10 B. Lamas, J. Talvas, R. Nachat-Kappes, N. Goncalves-Mendes, A. Rossary, S. Rougé, K. Combe, MC. Farges et MP. Vasson. “ Réponse tumorale à un apport hypercalorique chez la souris *nude* ”. 7^{ème} Journée Scientifique du CLARA, Lyon, 20 et 21 mars 2012.

Résumé

Les cellules Natural Killer (NK), actrices majeures de la vigilance anti-tumorale, sont modulées par des facteurs nutritionnels et métaboliques. L'inhibition de leur activité favorise le développement tumoral. Un régime alimentaire hypercalorique induisant l'obésité est un facteur de risque de développer un cancer du sein. Au niveau du micro-environnement tumoral mammaire, la biodisponibilité en certaines molécules contrôle non seulement les cellules néoplasiques mais, également les cellules immunes infiltrées. Ainsi, la leptine, sécrétée à forte concentration par les adipocytes mammaires, pourrait favoriser la croissance tumorale et altérer les cellules NK. L'arginine fortement consommée par les cellules tumorales et les cellules suppressors dérivées des myéloïdes pourrait faire défaut aux cellules NK.

L'objectif de cette thèse est de caractériser les activités fonctionnelles et métaboliques des cellules NK en situation de stress nutritionnel. Dans un premier temps, nous avons exploré, *in vivo*, l'impact d'un régime hypercalorique sur l'activité des cellules NK et sur le développement tumoral mammaire. Ensuite, nous avons cherché à identifier les potentielles altérations fonctionnelles des cellules NK en mimant, *in vitro*, les conditions retrouvées au niveau du micro-environnement tumoral telles que la présence de concentration élevée en leptine et la déplétion en arginine.

Des souris Balb-c « nude » femelles ont été soumises à un régime hypercalorique (HC) *versus* une diète normo-calorique (NC) pendant 6 mois. Au bout de 5 mois, des cellules tumorales mammaires (MCF-7 ; groupes NCT et HCT) ou le véhicule (groupes NC et HC) ont été implantés au niveau de la quatrième paire de glandes mammaires. Sous régime HC, le développement tumoral s'accompagne d'une perte de masse grasse, de masse maigre et de poids corporel avec un volume et un poids de tumeur augmentés. Cette diète induit au niveau tumoral une sur-expression des ARNm d'enzymes impliquées dans la glycolyse et une sous-expression des acteurs du cycle de Krebs. Sous régime HC, l'expression de la caspase 3 clivée et des récepteurs des œstrogènes β et à la progestérone est réduite alors que celle du Ki67 est accrue. Les cellules NK des souris HC ont une cytotoxicité diminuée. Bien que la présence de tumeur stimule l'activité lytique des cellules NK, la cytotoxicité de ces cellules reste inférieure dans le groupe HCT comparativement à celle du groupe NCT.

La leptine stimule, *in vitro*, de façon dose-dépendante l'activité métabolique des cellules NK. A fortes concentrations, elle active leur cytotoxicité vis-à-vis des cellules cibles MDA-MB-231. Cet effet passe par une stimulation de l'expression de TRAIL et de l'IFN- γ par les cellules NK. En revanche, vis-à-vis des cellules cibles MCF7, les cellules NK présentent une activité lytique réduite en présence de fortes concentrations de leptine, probablement en lien avec une réduction de l'expression de la perforine.

En réponse à une déplétion en arginine dans le milieu de culture, la prolifération et la cytotoxicité des cellules NK sont abaissées. L'altération de la reconnaissance des cellules cibles par les récepteurs NKp46 et NKp30, la moindre transmission du signal activateur par la chaîne ζ et la faible production d'IFN- γ peuvent expliquer l'inhibition de la cytotoxicité des cellules NK.

Ainsi, un apport énergétique élevé favorise le développement tumoral mammaire notamment en inhibant la cytotoxicité des cellules NK. De plus, la leptine à fortes concentrations stimule ou réduit, *in vitro*, la cytotoxicité des cellules NK selon la nature des cellules cancéreuses mammaires cibles. Une déplétion en arginine, *in vitro*, quant à elle, inhibe la prolifération et la cytotoxicité des cellules NK. Ces travaux contribuent à mieux comprendre l'impact du micro-environnement sur la réponse anti-tumorale des cellules NK.

Mots clés : cellules natural killer, modulation nutritionnelle, leptine, arginine, tumeurs mammaires humaines, xénogreffe, souris « nude ».